



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAFAELA PIRES ERTHAL

**EXPOSIÇÃO A BAIXAS DOSES DE MALATION DURANTE  
OS PERÍODOS JUVENIL E PERIPUBERAL ALTERA  
PARÂMETROS TESTICULARES, EPIDIDIMÁRIOS E  
ESPERMÁTICOS DE RATOS**

---

Londrina  
2018

RAFAELA PIRES ERTHAL

**EXPOSIÇÃO A BAIXAS DOSES DE MALATION DURANTE  
OS PERÍODOS JUVENIL E PERIPUBERAL ALTERA  
PARÂMETROS TESTICULARES, EPIDIDIMÁRIOS E  
ESPERMÁTICOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Glaura Scantamburlo  
Alves Fernandes

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Erthal, Rafaela Pires.

Exposição a baixas doses de Malation durante os períodos juvenil e peripuberal altera parâmetros testiculares, epididimários e espermáticos de ratos / Rafaela Pires Erthal. - Londrina, 2018.  
133 f. : il.

Orientador: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2018.  
Inclui bibliografia.

1. Inseticidas - Efeito fisiológico - Tese. 2. Testículos - Tese. 3. Epidídimo - Tese. 4. Aparelho genital masculino - Tese. I. Fernandes, Glaura Scantamburlo Alves. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

RAFAELA PIRES ERTHAL

**EXPOSIÇÃO A BAIXAS DOSES DE MALATION DURANTE OS  
PERÍODOS JUVENIL E PERIPUBERAL ALTERA PARÂMETROS  
TESTICULARES, EPIDIDIMÁRIOS E ESPERMÁTICOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Mariangela Hungria  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo  
Alves Fernandes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dra. Larissa Staurengo Ferrari  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dr. Eduardo José de Almeida Araújo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 06 de abril de 2018.

Dedico este trabalho,  
Aos meus pais, que desde meus  
primeiros passos me incentivaram a  
enxergar além e a lutar por meus  
objetivos.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer é saber reconhecer que, na vida, nada é feito sozinho. É saber o valor de cada pessoa em uma etapa. Sou grata a cada um que de maneira direta ou indireta, com uma ajuda grande ou pequena, contribuiu para o desenvolvimento do presente trabalho.

Sou grata a Deus, Àquele que me permitiu chegar até aqui abrindo as portas, e principalmente, que me deu forças para não desanimar quando o caminho foi difícil. Ele mesmo não prometeu que seria fácil, mas que estaria sempre ao meu lado. Obrigada Senhor, é uma honra saber que o Criador do Universo se importa e cuida de mim.

Agradeço minha querida orientadora, Professora Dra. Glaura Scantambulo Alves Fernandes por possibilitar essa oportunidade. Sem você, nada disso teria acontecido. Foi quem confiou em mim quando muitas vezes eu descreditei. Agradeço pela orientação, pela confiança, pela amizade e pelas vezes que me motivou. Obrigada por ser sempre presente.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental pela oportunidade. Também à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro. Agradeço ao Coordenador do programa, Wander Pavanelli, por dedicar tanto do seu tempo buscando um programa de qualidade, e ao secretário Sérgio, por nos atender tão prontamente tirando nossas dúvidas e nos auxiliando durante os dois anos.

Agradeço também aos professores do programa de pós-graduação pelo conhecimento adquirido. Cada professor com sua metodologia ou características pessoais foi essencial para meu crescimento profissional e também pessoal. Sou grata a cada um.

Aos técnicos de laboratório, Jesus (Zui), Melissa, Dário e Carlinhos. A participação de vocês durante a experimentação e o desenvolvimento das análises foi essencial. Sem o conhecimento e ajuda de vocês, seria muito mais difícil.

Não poderia deixar de agradecer aos amigos. Eliane Swely e Jackson, nosso trio de todos os trabalhos e disciplinas. Agradeço pelas milhões de vezes que estudamos, montamos apresentações e aprendemos juntos. Eu tenho certeza que

com vocês foi muito mais leve. Agradeço também à turma de mestrado por ser tão unida, o companheirismo fez a diferença, em especial à Stephanie e Mariana.

Dentre os amigos, estão aqueles mais presentes, em que a boa convivência é essencial. São os amigos de laboratório. Sou grata a Deus porque são vocês, os melhores companheiros de laboratório que poderia ter. Daniele, Dayane e Suellen que chegaram mais no final mas já são muito especiais. Obrigada pelos conselhos e apoio durante essa fase final. Também sou grata à Gêssica e Carol pela amizade, mesmo não estando mais presentes diariamente na minha vida. Gláucia e Ana, as duas parceiras desde a graduação, obrigada pela amizade e parceria de vocês, vocês são muito importantes para mim.

Sou grata aos laboratórios de parceria que me possibilitaram fazer análises importantes para o presente trabalho. Ao Professor Dr. Waldiceu pelas análises de inflamação e à Larissa e Victor pela paciência em ensinar. À Professora Dra. Flávia pelas análises de estresse oxidativo, mesmo estando fisicamente longe. Também agradeço ao Professor Dr. Rodrigo pelas análises estatísticas de meus dados. Sua participação foi fundamental para confiabilidade dos meus resultados.

Sou grata ao Professor Dr. Eduardo Araújo e à Dra. Larissa por aceitar fazer parte dessa banca de defesa de mestrado. É uma honra ter a presença de pessoas tão qualificadas ajudando a aprimorar meu trabalho. Obrigada por fazer parte desse momento tão importante para mim.

Não poderia deixar de agradecer meu namorado, Jimmy. Não consigo mensurar sua importância nessa fase de minha vida. Obrigada por todos os finais de semana que me acompanhou ao tratar os animais. Obrigada pelo apoio, por me dar forças para suportar as dificuldades e me ajudar a seguir em frente.

E por último, agradeço à minha família. Daninha, minha irmã, obrigada por entender que estar longe as vezes é necessário, e me desculpe por não poder estar sempre com você. Papai e mamãe, meus profundos agradecimentos são a vocês. Vocês lutam por mim mesmo quando tudo está tão difícil. Sempre me apoiaram e confiaram em mim. O amor e carinho de vocês faz toda a diferença. Obrigada por me apoiarem desde o começo de tudo e por estarem comigo em cada escolha que eu faço. Eu amo muito vocês!

**“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muita, nos aproxima.”**

**Louis Pasteur**

ERTHAL, Rafaela Pires. **Exposição a baixas doses de Malation durante os períodos juvenil e peripuberal altera parâmetros testiculares, epididimários e espermáticos de ratos**. 2018. 133 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

O malation é um inseticida organofosforado amplamente utilizado para controle de insetos em culturas agrícolas ou do mosquito *Aedes aegypti*, vetor de doenças causadas pelos vírus da dengue, zica e chikungunya. A população fica exposta ao inseticida através de alimentos ou ar contaminados durante o processo de pulverização. Os períodos juvenil e peripuberal compreendem uma fase complexa do desenvolvimento testicular e epididimário, sendo crítica para obtenção da capacidade reprodutiva. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a exposição a baixas doses de malation durante os períodos juvenil e peripuberal pode prejudicar o desenvolvimento pós-natal testicular e epididimário de ratos. Para isso, foram utilizados 45 ratos machos Wistar organizados em três grupos experimentais: dois grupos tratados com malation 10 mg/kg (M10) ou 50 mg/kg (M50). O grupo controle recebeu apenas o veículo (solução salina 0,9%). Os animais foram tratados diariamente do dia pós natal (DPN) 25 ao 65 via gavagem. No DPN65, os ratos foram pesados, anestesiados e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. O sangue coletado foi destinado à determinação de nível plasmático de testosterona. Os testículos e epidídimos foram retirados, pesados e utilizados para contagem espermática, avaliação de peroxidação lipídica, avaliação de parâmetros histológicos, estereológicos ou morfométricos, bem como avaliação de perfil inflamatório através da atividade de MPO e NAG e níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IL-10). Espermatozoides do ducto deferente foram utilizados para avaliação da morfologia e motilidade espermática. Os pesos corporal, testicular e epididimário foram semelhantes entre os grupos experimentais. Nos testículos, a exposição ao malation 50 mg/kg levou à diminuição em níveis plasmáticos de testosterona e aumento em níveis de peroxidação lipídica comparados ao grupo controle. Além disso, animais expostos a ambas as doses de malation apresentaram diminuição na contagem espermática, número de células de Sertoli e de Leydig, aumento de túbulos seminíferos anormais, alteração da dinâmica espermatogênica e aumento de espermatozoides anormais em relação ao grupo controle. Apenas a menor dose do inseticida levou ao aumento de níveis de IL-10 em relação ao grupo controle. A morfometria testicular e a avaliação de migração de células inflamatórias permaneceu inalterada após exposição ao malation. Em relação aos epidídimos, foi observada a presença de anormalidades na cabeça do órgão após exposição ao malation 10 ou 50 mg/kg quando comparado ao grupo controle. As contagens espermáticas tanto na cabeça quanto na cauda epididimária não diferiram do grupo controle, assim como os níveis de peroxidação lipídica. Em contrapartida, a maior dose levou ao remodelamento do tecido epididimário, aumento de migração de neutrófilos e macrófagos da cabeça do órgão e diminuição em níveis de IL-1 $\beta$  na mesma região epididimária em relação ao grupo controle. Além de diminuir os níveis de IL-1 $\beta$ , a dose menor reduziu níveis de IL-6 e levou à diminuição da motilidade espermática. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o malathion, mesmo em baixas doses, afeta o desenvolvimento testicular e epididimário de ratos juvenis e peripuberais.

**Palavras-chave:** Malation. Testículo. Epidídimo. Peripuberdade. Espermatozoide.

ERTHAL, Rafaela Pires. **Exposure to low doses of Malathion during juvenile and peripubertal period alters testicular, epididymal and sperm parameters of rats.** 2018. 133 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology Postgraduation) – Universidade Estadual Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Malathion is an organophosphate insecticide widely used in to control insect both in feed crops or *Aedes aegypt* control, vector of diseases causes by dengue, zyka and chikungunya virus. Population is exposed to insecticide through contaminated food or air during spraying process. The juvenile and peripubertal periods represents a period of complex testicular and epididymal development, being critical to reaching reproductive capability. The aim of the present study was to evaluate whether exposure to low doses of malation during juvenile and peripubertal periods may impair the testicular and epididymal postnatal development in rats. For this, forty-five male Wistar rats were used and organized in three experimental groups: two malathion-treated groups at doses of 10mg/kg (M10) or 50 mg/kg (M50). The control group received only vehicle (saline 0.9%). The animals were daily treated from postnatal day (PND) 25 to 65 per oral gavage. On PND65, rats were weighed, anesthetized and euthanized by cardiac puncture. The blood was collected for determination of plasma testosterone concentrations. Testis and epididymis were removed, wheighed and user for sperm count, oxidative stress status assay, evaluation of histological, stereological or morphometric parameters, as well as inflammatory profile through MPO and NAG activity and cytokine levels (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10). Sperm from vas deferens were subjected to sperm morphology and motility. The weight of body, testis and epididymis were similar between experimental groups. In testis, the malathion 50 mg/kg exposure led to a reduction in plasma testosterone concentration and increase in lipid peroxidation levels when compared to control group. Furthermore, the animals exposed to both malathion doses showed decrease in sperm count, Sertoli and Leydig cells number, increase in abnormal seminiferous tubules, altered spermatogenesis kinects and an increase in abnormal sperm in relation to control group. Only lower insectice dose lad to increase in IL-10 level in relation to control group. The testicular morphometry and evaluation of inflammatory cells migration remained unaltered after malathion exposure. In relation to epididymis, it was observed the presence of abnormalities in caput epididymis after malathion exposure 10 or 50 mg/kg compared to control group. The sperm count both in caput or cauda epididymis and lipid peroxidation levels did not differ from control group. On the other hand, the higher dose lead to epididymal tissue remodeling, increase in neutrophil and macrophage migration in caput epididymis and decrease in IL-1 $\beta$  levels on the same epididymal region in relation to control group. Besides decrease the IL-1 $\beta$  levels, the lower dose also reduced IL-6 levels and lead to decrease in sperm motility. According to these results, we concluded that malathion, even in low doses, affects the testicular and epididymal development of juvenils and peripubertal rats.

**Keywords:** Malathion. Testis. Epididymis. Peripuberty. Spermatozoa.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Aspecto macroscópico do sistema genital masculino humano e de rato .....	12
<b>Figura 2</b> – Representação de túbulo seminífero e espaço intersticial .....	13
<b>Figura 3</b> – Ciclo do epitélio seminífero da espermatogênese	16
<b>Figura 4</b> – Ação dos hormônios LH e FSH nos testículos .....	17
<b>Figura 5</b> – Fórmula estrutural básica dos compostos organofosforados .....	31
<b>Figura 6</b> – Ação dos compostos organofosforados .....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-1O2	Oxigênio Singlet
4-HNE	4-hidroxinoneal
ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
AChE	Acetilcolinesterase
ACP	Enzime-Acyl Carrier Protein (Proteína Carreadora de Acila)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças)
BchE	Butilcolinesterase
BHT	Barreira hemato testicular
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DCA	Ácido Dicarboxílico Malaoxon
DL50	Dose Letal Mediana
DMP	O,O-dimetilfosfato
DMPDT	O,O-dimetil-fosforoditioato
DMPT	Ácido Fosforotioico Dimetil
DPN	Dia Pós-Natal
EGF	Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidérmico)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAO	Food and Agricultura Organization (Organização da Comida e Agricultura)
FasL	ligante de Fas
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fator de Crescimento de Fibroblastos)
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas)
GSH-Px	glutaciona peroxidase
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
HO2	Hidroperoxila
IARC	Agência Internacional para Pesquisa do Câncer
IGF	Insulin-like Growth Factor (Fator de crescimento semelhante à insulina)
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta

IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LDH	Lactato Dehydrogenase (Lactato Desidrogenase)
LH	Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)
LHR	Luteinizing Hormone Receptor (Receptor de hormônio luteinizante)
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MCA	Ácido Monocarboxílico Malathion
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NO	Óxido Nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion Superóxido
OFs	Organofosforados
-OH	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.c.	Peso Corpóreo
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Pattern (padrões moleculares associados a patógenos)
PLOOH	Hidroperóxidos fosfolipídicos
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SOD	Superóxido Dismutase
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein (Proteína Reguladora Aguda Esteroidogênica)
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor alpha (Fator de crescimento transformador alfa)
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta (Fator de crescimento transformador beta)
TLR	Toll-like Receptor (Receptores semelhantes a Toll)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (Receptor 1 de Fator de necrose Tumoral)
Treg	Linfócito T reguladores
$\gamma$ -GT	Gammaglutamiltransferase

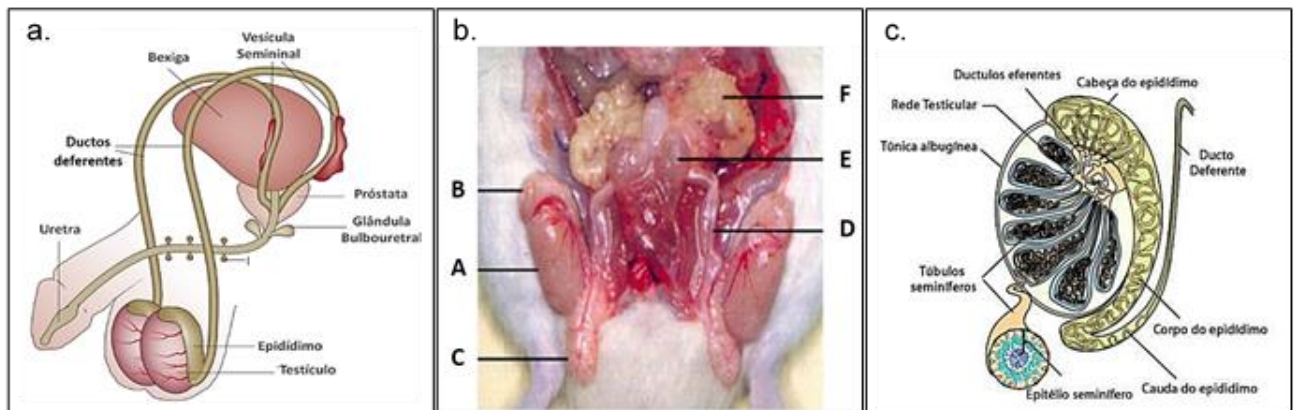
## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	SISTEMA GENITAL MASCULINO .....	12
1.2	DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO SISTEMA GENITAL MASCULINO .....	20
1.3	SISTEMA GENITAL MASCULINO E INFLAMAÇÃO .....	22
1.4	SISTEMA GENITAL MASCULINO E ESTRESSE OXIDATIVO .....	25
1.5	AGROTÓXICOS E A CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL .....	28
1.6	ORGANOFOSFORADOS.....	30
1.7	MALATION.....	33
1.8	MALATION E FUNÇÃO REPRODUTIVA .....	37
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	40
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	41
3.1	GERAL .....	41
3.2	ESPECÍFICOS .....	41
<b>4</b>	<b>ARTIGO1</b> .....	42
<b>5</b>	<b>ARTIGO 2</b> .....	82
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	112
	<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO DA INTRODUÇÃO</b> .....	113
	<b>ANEXO A</b> .....	132
	<b>ANEXO B</b> .....	133

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SISTEMA GENITAL MASCULINO

O sistema genital masculino, tanto de humanos (Figura 1a) quando de roedores (Figura 1b), é composto por testículos, epidídimos, ductos deferentes, pênis e pelas glândulas sexuais acessórias: próstata, vesícula seminal e bulbouretrais.

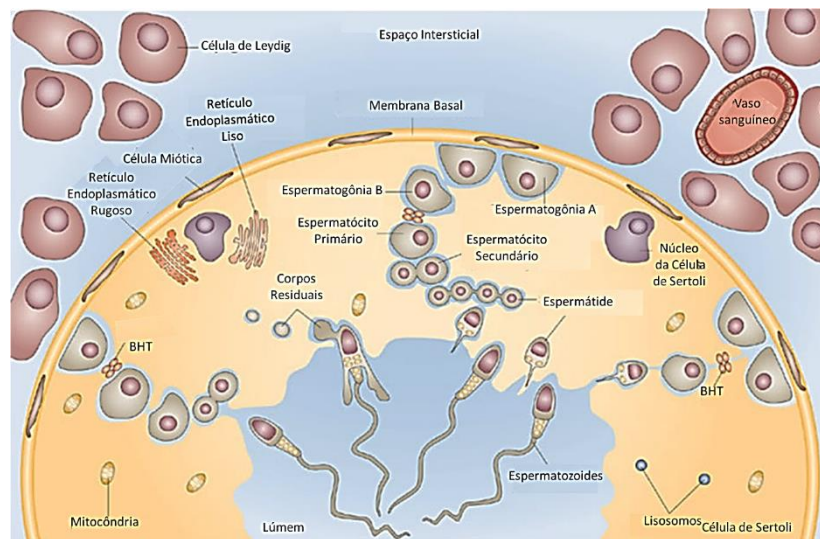


**Figura 1.** Aspecto macroscópico do sistema genital masculino humano e de rato. **a.** Anatomia do sistema genital masculino (adaptado de Drabovich *et al.*, 2014). **b.** Anatomia do sistema genital de rato macho: A – Testículo; B – Cabeça de epidídimo; C – Cauda de epidídimo; D – Ducto deferente; E – Próstata; F – Vesícula seminal (PEROBELLI, 2012) **c.** Corte transversal de testículo e epidídimo, apresentando a localização dos túbulos seminíferos e ducto epididimário (adaptado de Lagarrigue *et al.*, 2011).

Os testículos são órgãos pares localizados no interior do escroto, revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso – a túnica albugínea. Externamente a essa túnica, encontra-se uma camada de peritônio visceral, a túnica vaginal, que também reveste a superfície interior da bolsa escrotal (KOMÁREK, 2000). Morfologicamente, os testículos são compostos por túbulos seminíferos e tecido intersticial (Figura 1c), responsáveis pela espermatogênese e esteroidogênese, respectivamente (RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999).

Em humanos, a túnica albugínea é espessada na superfície dorsal dos testículos formando o mediastino, do qual partem septos fibrosos. Essa septação organiza o testículo de humanos em lóbulos testiculares que compartimentalizam os

túbulos seminíferos (Figura 1c). No rato adulto, cada testículo apresenta em média 20 túbulos seminíferos, uma quantidade escassa de tecido conjuntivo e não estão organizados em lóbulos. Na porção final de cada túbulo seminífero, observa-se um epitélio de transição, onde os túbulos são denominados túbulos retos, os quais conectam os túbulos seminíferos a uma rede de canais anastomosados, denominada rede testicular (FOLEY, 2001). Em animais adultos, os túbulos seminíferos são constituídos por um epitélio germinativo, composto por células somáticas de Sertoli e células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos primários, secundários e espermatídes), as quais estão organizadas em camadas concêntricas (Figura 2).



**Figura 2.** Representação de túbulo seminífero e espaço intersticial. A figura demonstra a localização das células somáticas (células de Leydig, células de Sertoli e células mioides) e células de linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides) presentes no túbulo seminífero. Diferenciação das células germinativas até a formação do espermatozoide (adaptado de Rato et al. (2012)).

O interstício testicular é composto por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, linfáticos, nervos, macrófagos residentes e células de Leydig, responsáveis pela produção de andrógenos, substrato para uma variedade de outros hormônios esteroides, como a testosterona (RUSSEL, 1990). As células de Leydig possuem retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com enzimas que estão associadas à síntese de esteroides, o citoplasma é eosinofílico e o núcleo é arredondado ou alongado e essas células são as responsáveis pela produção de testosterona (HODGSON; HUDSON, 1983; MORI; CHRISTENSEN, 1980). A testosterona é

produzida quando o hormônio luteinizante (LH) se liga aos receptores na membrana plasmática da célula de Leydig (LHR), estimulando a síntese de uma proteína reguladora esteroideogênica (StAR), que iniciará uma cascata de eventos, no qual o colesterol será convertido em pregnenolona nas mitocôndrias e em seguida, será transferida para o retículo endoplasmático liso onde ocorrerá a conversão de pregnenolona em testosterona (ZIRKIN; CHEN, 2000). Na puberdade a testosterona é responsável pelo aparecimento das características sexuais secundárias e por sua manutenção (RICHMOND; ROGOL, 2007). Em adultos a testosterona é responsável pela manutenção da barreira hemato-testicular (BHT) e pela estimulação da espermatogênese e a espermiogênese (MRUK; CHENG, 2015).

A célula de Sertoli é uma célula somática presente nos túbulos seminíferos que se estende desde a lâmina basal até a luz. Possui funções variadas que são importantes no processo espermatogênico (FOLEY, 2001). As células de Sertoli formam a membrana basal que serve de suporte para ela (DYM, 1994). Dentre as principais funções das células de Sertoli, destaca-se o apoio estrutural para as células da linhagem germinativa e a formação da BHT através de junções oclusivas. Essas oclusões organizam o epitélio em ambiente basal (onde localizam-se as espermatogônias e os espermatócitos I em pré-leptóteno) e o ambiente adluminal (onde localizam-se os espermatócitos I em zigóteno, espermatócitos II e espermátides em diferentes estágios de diferenciação). O ambiente adluminal proporciona um meio isolado do sistema imunológico, sendo de extrema importância para que o processo da espermatogênese ocorra de forma correta (FRANÇA et al., 2016).

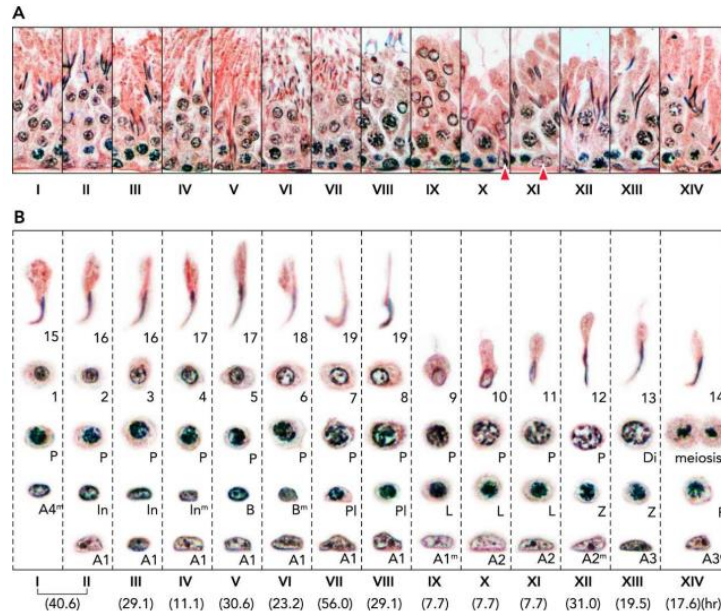
Além disso as células de Sertoli são responsáveis pelo fornecimento de energia, secreção de nutrientes (aminoácidos, carboidratos, lipídios, vitaminas e íons metálicos), fatores de crescimento (fator de células-tronco, fatores de crescimento transformadores alfa e beta (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ )), fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-I), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF)) (MRUK; CHENG, 2004) e fatores necessários para o metabolismo das células germinativas (lactato, transferina e proteína de ligação a andrógenos) (SKINNER; ANWAY, 2005). Também estão envolvidos na transdução dos sinais provenientes do hormônio folículo estimulante (FSH) e da testosterona em fatores que são essenciais para espermatogênese (WALKER; CHENG, 2005),

exercem participação ativa no processo de espermiacção, fazem a fagocitose dos corpos residuais, secretaram fluidos para o lúmen do túbulo para facilitar a migração dos espermatozoides para o epidídimo e secretam hormônios importantes para a espermatogênese (FOLEY, 2001; GRISWOLD, 1998). Dessa forma, alterações no número, estrutura e função deste tipo celular podem resultar no comprometimento da espermatogênese (BOEKELHEID; JOHNSON; RICHBURG, 2005).

O processo espermatogênico é dividido em três fases: proliferativa, meiótica e espermiogênica (CLERMONT, 1972; RUSSEL, 1990). A fase proliferativa ou mitótica caracteriza-se pela proliferação de células tronco espermatogoniais com a finalidade de aumentar a população desse tipo celular (espermatogônias tipo A). Partes destas espermatogônias, as espermatogônias tipo B, ligadas entre si por pontes citoplasmáticas, diferenciam-se e formam os espermatócitos primários (AMANN, 1986; RUSSEL, 1990). Na fase meiótica, os espermatócitos primários (diploides) sofrem meiose I originando os espermatócitos secundários (haploides), que por sua vez sofrem meiose II formando espermátides arredondadas (haploides). As espermátides arredondadas passam por um processo de citodiferenciação denominado espermiogênese, no qual ocorre condensação do material genético, formação do acrossoma, reposicionamento das mitocôndrias, perda de citoplasma e formação do flagelo, originando espermátides tardias, que permanecem presas ao epitélio germinativo. Uma vez liberadas na luz dos túbulos seminíferos, as espermátides tardias passam a ser denominados espermatozoides (CLERMONT, 1972).

A duração total da espermatogênese em mamíferos, baseada em 4,5 ciclos espermatogênicos, é de aproximadamente 30 a 75 dias (SHARPE, 1993), sendo geralmente constante dentro de cada espécie (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005). Cada geração de células germinativas se encontra em um mesmo estágio de desenvolvimento, sendo produzidas aproximadamente ao mesmo tempo e de maneira sincronizada. As várias gerações destas células formam associações celulares de composição fixa, denominadas estágios do ciclo da espermatogênese. No rato, o número de estágios da espermatogênese são 14 (Figura 3), mas este número varia de acordo com a espécie (CLERMONT, 1972). Para que a espermatogênese ocorra de forma correta são necessárias interações entre as células da linhagem germinativa e os componentes somáticos do testículo, sendo

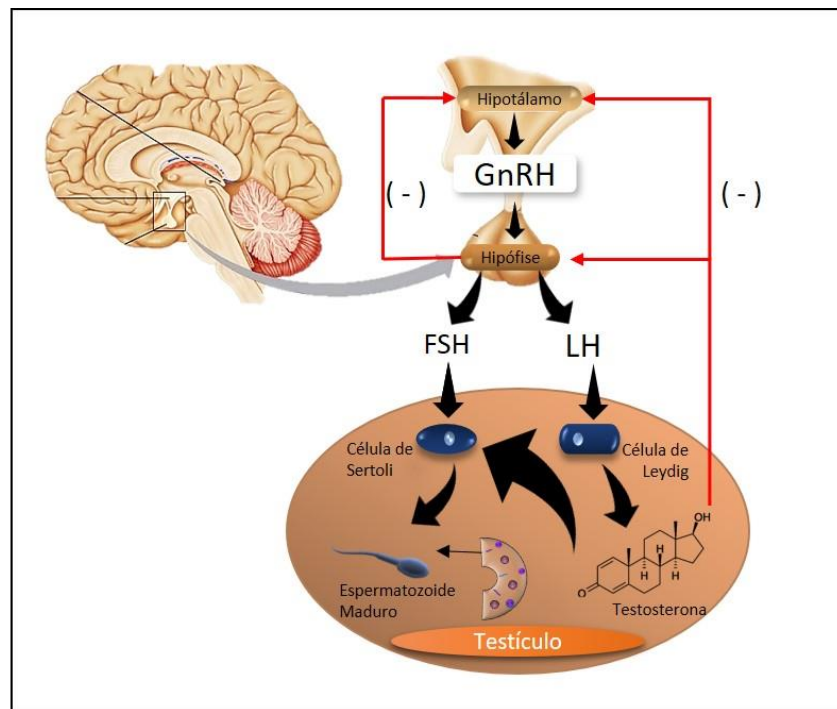
que, uma alteração em qualquer fase da espermatogênese pode levar à interrupção do funcionamento correto do tecido e culminar na infertilidade (AMORY; BREMNER, 2001).



**Figura 3.** Ciclo do epitélio seminífero da espermatogênese. (A) Cada fase do ciclo do epitélio seminífero ilustra a associação única de células germinativas específicas com a célula de Sertoli (ponta de seta vermelha). (B) Mostra os diferentes tipos de células germinativas que são encontrados em cada fase do ciclo. Por exemplo, na fase VIII, com duração de aproximadamente 29,1 horas no rato, espermátides 19 alinham-se próximo ao lúmen tubular para a espermição. Todo o ciclo de I a XIV leva aproximadamente 12,9 dias para se completar. Porém, para que uma espermatogônia A tipo II se torne uma espermátide 19, são necessários cerca de 4,5 ciclos, o que leva por volta de 58 dias (adaptado de Xiao *et al.* (2014)).

O processo de espermatogênese é diretamente regulado pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e inicia-se a partir da puberdade. A hipófise, por influência hipotalâmica, secreta dois hormônios sexuais que exercem o controle da função testicular, o LH e o FSH (RUSSEL, 1990). O FSH atua sobre as células de Sertoli, estimulando suas funções sobre a espermatogênese, e o LH sobre as células de Leydig, estimulando a produção de andrógenos, principalmente a testosterona (Figura 4) (CHRISTENSEN; MASON, 1965; LIPSETT, 1976). Em roedores pré-púberes, tanto a testosterona quanto o FSH podem aumentar o número de células de Sertoli, sendo este último mais efetivo (SMITH; WALKER, 2015). Em ratos, o FSH apresenta atuação específica sobre o estágio inicial de desenvolvimento espermatogonial (MEACHEM; MCLACHLAN, 1999), enquanto a

testosterona regula principalmente a espermiogênese (KERR et al., 1992). Estes hormônios atuam em cooperação nos demais estágios da espermatogênese, estimulando o início do processo meiótico e promovendo o desenvolvimento de espermatócitos e a produção de espermátides arredondadas (KERR et al., 1992) (Figura 3).



**Figura 4.** Ação dos hormônios LH e FSH nos testículos. LH- Hormônio Luteinizante; FSH- Hormônio Folículo estimulante; GnRH- Hormônio liberador de gonadotrofina. Fonte: Rafaela Pires Erthal.

Nos testículos, os túbulos seminíferos se convergem e formam a rede testicular, a qual tem continuidade com os ductulos eferentes. Por sua vez, tais ductulos convergem para formar um ducto único e altamente enovelado, o epidídimo, que vai se ligar através de sua porção terminal ao ducto deferente. O comprimento do ducto epididimário varia de acordo com a espécie, sendo 3 metros em ratos e aproximadamente 6 metros no homem (ROBAIRE et al., 2006).

Em roedores, este órgão é dividido em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (ROBAIRE; HINTON, 2015). Utilizando os mesmos critérios, o epidídimo humano é dividido em apenas três regiões, denominadas cabeça, corpo e cauda. A ausência de segmento inicial se deve ao fato da maior parte da cabeça do epidídimo humano ser constituída por ductos eferentes (TURNER, 2008). Estas porções são

histologicamente subdivididas em zonas, sendo: 1A, 1B, 2A, 2B, 3A e 3B para a região da cabeça; 4A e 4B para a região do corpo; 5A, 5B, 6A e 6B para a região da cauda (MILLER; KILLIAN, 1987). As zonas são designadas de acordo com a altura do epitélio e distribuição e quantidade dos seus seis tipos de células (CLELAND, 1957) os quais são: basais, principais, estreitas, halo, claras e apicais (HERMO; ROBAIRE, 2002).

Ao deixarem os testículos, os espermatozoides são morfológicamente completos mas ainda não exibem atividade móvel e são incapazes de fecundar um ovócito II (DACHEUX; DACHEUX, 2014). Dessa maneira, além do transporte de espermatozoides, o epidídimo tem papel crucial sobre a maturação espermática, regulando o desenvolvimento da motilidade, da capacidade de sofrer reação acrossômica e de reconhecer e fundir-se com o ovócito, além de ser o local onde ocorrem importantes modificações da membrana plasmática dos espermatozoides. Em adição, o epidídimo protege os espermatozoides de espécies reativas de oxigênio (ERO) e estoca os gametas maduros na região da cauda (COSENTINO et al., 1985; HERMO; ROBAIRE, 2002; ROBAIRE et al., 2006).

Estas funções são executadas dentro dos diferentes ambientes luminiais presentes ao longo do ducto epididimário (RODRIGUEZ; KIRBY; HINTON, 2002). A maturação espermática no ducto epididimário parece depender de uma interação altamente regulada entre a lâmina própria, células epiteliais e fluido luminal que banha os espermatozoides (BEDFORD, 1975; KEMPINAS; KLINEFELTER, 2010; ORGEBIN-CRIST et al., 1975). Este processo consiste em um intenso remodelamento da membrana do espermatozoide, em que proteínas de origem testicular são removidas ou modificadas e proteínas epididimárias são secretadas e adsorvidas à membrana espermática ou apenas interagem com o gameta, a fim de que este adquira sua capacidade funcional (BARRIOS, 2005; CUASNICÚ et al., 2002; DA ROS et al., 2004). Cada etapa da maturação é decisiva para a qualidade espermática e não está sob o controle genômico das células germinativas (DACHEUX et al., 2005; ROBERTS, 1995). O microambiente intraluminal do epidídimo é altamente regulado pela atividade secretora e absorviva das células epiteliais (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). O processo de maturação do epidídimo é dependente da ação de andrógenos (EZER; ROBAIRE, 2002).

O ducto deferente é um órgão par que liga o epidídimo à uretra prostática. Apesar de ter sido por muito tempo considerado um simples condutor dos espermatozoides no momento da ejaculação, estudos posteriores têm mostrado importantes funções do epitélio do ducto em relação aos espermatozoides, como término do processo de maturação espermática (KOMÁREK, 2000). O ducto deferente se insere na próstata e se abre na uretra prostática. O segmento que entra na próstata é chamado de ducto ejaculatório, cuja mucosa é semelhante a do ducto deferente, porém não é envolta por músculo liso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Em roedores, as glândulas sexuais são a glândula seminal, próstata, glândula coaguladora, glândula bulbouretral e glândula prepucial. Elas estão localizadas ao longo do trajeto que os espermatozoides fazem pela uretra, ou seja, do ducto deferente ao pênis (HASCHEK; ROUSSEAU, 1998). As funções das glândulas sexuais acessórias estão principalmente relacionadas à produção de secreções, que contribuem para a nutrição e suporte dos espermatozoides pós-ejaculação, ou seja, fora do sistema genital masculino. Estas funções dependem da ação de andrógenos e por isso refletem mudanças do estado endócrino e/ou da função testicular (CLEGG; PERREAULT; KLINEFELTER, 2001; MANN, 1974).

Nos mamíferos, o sêmen é depositado diretamente no trato genital feminino pelo órgão copulador, o pênis. O corpo do pênis do rato é formado por dois corpos cavernosos penianos e um corpo cavernoso uretral, ou seja, dois ramos do pênis, um corpo esponjoso e a uretra (CHIASSON, 1988). Histologicamente, o corpo cavernoso é constituído por tecido erétil com auréolas calibrosas, revestidas por uma espessa camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea (MURAKAMI; MIZUNO, 1986). Além disso, o pênis do rato apresenta um osso peniano localizado centralmente na glândula. Este osso inicia-se na transição do corpo para a glândula, como uma continuação do corpo cavernoso do pênis (HEBEL; STROMBERG, 1976).

No homem, o pênis é composto por três colunas de tecido erétil, sendo duas colunas chamadas de corpos cavernosos, localizadas dorsalmente e uma coluna chamada de corpo esponjoso, localizada ventralmente e onde está inserida a porção peniana da uretra. Cada qual está contida dentro de uma capsula de tecido conjuntivo fibroso, a túnica albugínea. A região distal do corpo esponjoso termina em uma porção bulbosa dilatada, a glândula do pênis, que é perfurada em sua extremidade formando o óstio da uretra (GARTNER; HIATT, 2007). Quando chegam

na uretra, os espermatozoides já estão envoltos por líquido seminal, denominado de sêmen.

Em mamíferos o sêmen é depositado dentro do lúmen vaginal devido à resposta do arco reflexo que leva à estimulação sensorial do pênis, seguida de estimulação motora simpática do músculo liso do sistema genital masculino e estimulação motora somática da musculatura associada à musculatura tubular do sistema genital masculino (STEERS, 1994).

## 1.2 DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO SISTEMA GENITAL MASCULINO DE RATOS

Após o nascimento, o período de desenvolvimento do rato pode ser classificado em quatro fases: neonatal (dia pós-natal – DPN 1 – 7), infantil (DPN 8-21), juvenil (DPN 22-35) e peripuberal (DPN 36 – 55 ou 65). O animal é considerado adulto quando atinge sua maturidade sexual (OJEDA et al., 1980). Todas as fases são reguladas por mecanismos relacionados com estados hormonais e genéticos do organismo (DAMGAARD et al., 2002).

A produção de testosterona inicia durante o final da gestação com posterior diminuição logo ao nascimento. Durante a fase infantil e juvenil de ratos (DPN 8-35) são produzidos os andrógenos primários, incluindo androstenediona, 5- $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -diol e diidrotestosterona (PODESTÁ; RIVAROLA; JYUJO, 1974). Entre os dias 28 e 56 pós-natal, as células de Leydig imaturas se dividem e diferenciam-se em células de Leydig adultas, com pouca ou ausente atividade mitótica, alta síntese de testosterona, aumento em número de receptores para LH e diminuição no número de receptores para andrógenos (BENTON; SHAN; HARDY, 1995). Além disso, as células epididimárias “narrow” e colunares em ratos passarão por um período de diferenciação entre DPN 16 e 44, seguido por um período de expansão (SUN; FLICKINGER, 1979). Esse período corresponde ao intervalo em que ocorrerá o primeiro grande aumento de peso epididimário, entre os DPN 49 e 63 (SCHEER; ROBAIRE, 1980).

Na fase da puberdade, ocorrem eventos dinâmicos e complexos do desenvolvimento sexual, que envolvem mudanças físicas, comportamentais e hormonais, através das quais a maturação sexual final ocorre e a capacidade reprodutiva é obtida (GOLUB et al., 2008). Essas mudanças são estabelecidas

devido à ocorrência de uma cascata de eventos que levam à maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Com o aumento da pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e aumento de síntese e secreção de LH e FSH, ocorre a mudança no perfil hormonal característica da puberdade, levando à síntese e secreção de esteroides (testosterona). A partir dessas mudanças, tem-se o início do ciclo reprodutivo da espécie (OJEDA; URBANSKI, 1994). Biologicamente, a puberdade é definida como o tempo em que a primeira espermatogênese completa todo o ciclo (KLINEFELTER et al., 1997).

Na fase peripuberal ocorrem importantes eventos, como a leve redução na proliferação e desenvolvimento das células germinativas, aumento nos níveis de testosterona e proliferação de células de Sertoli em humanos (O'SHAUGHNESSY, 2015; SHARPE, 2010). No entanto, esta fase tem sido relativamente pouco estudada (PEROBELLI, 2014).

As primeiras espermátides maduras em testículo de ratos são encontradas no DPN 40, enquanto que nos epidídimos os espermatozoides são observados apenas no DPN 50. Com base nestes relatos, o rato macho pode atingir a puberdade por volta de 50 dias de idade (ROBB; AMANN; KILLIAN, 1978).

Ratos com 75 dias de idade apresentam a máxima produção de espermatozoides no testículo e aos 100 dias, a máxima concentração de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo, atingindo neste período a maturidade sexual plena (ROBB; AMANN; KILLIAN, 1978; ZANATO et al., 1994).

Como a espermatogênese e a esteroidogênese ainda não estão totalmente estabelecidas durante a peripuberdade, esta pode ser uma fase crítica do desenvolvimento reprodutivo (JOHNSON; WELSH; WILKER, 1997). A exposição a químicos durante o período peripuberal pode resultar em consequências visíveis mesmo durante a puberdade, como efeitos sobre o crescimento, ou durante a vida adulta tardia, como efeitos sobre o comportamento e riscos de câncer (MANTOVANI; FUCIC, 2014).

Tais efeitos estão frequentemente associados com desreguladores endócrinos, os quais interferem na programação do desenvolvimento. Dessa maneira, exposição a tais substâncias durante períodos críticos do desenvolvimento (gestação, lactação e peripuberdade) pode causar prejuízos e comprometer a saúde reprodutiva do indivíduo na vida adulta.

### 1.3 SISTEMA GENITAL MASCULINO E INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta natural do organismo a uma variedade de danos teciduais, incluindo aqueles mediados por patógenos, substâncias irritantes, disfunção celular e trauma físico. Esta resposta envolve a ação de múltiplos tipos celulares, residentes e recrutados. Como consequência desse processo, o local afetado sofre modificações morfofisiológicas, resultantes das alterações na perfusão vascular, na permeabilidade e na produção de mediadores locais de inflamação, os quais irão promover o influxo de células imunes. Quando a resposta inflamatória é bem sucedida, resulta na resolução do dano inicial e seguinte restauração da homeostase tecidual (KARALIS et al., 2009).

Durante o início da maturidade sexual, ocorre uma transformação do testículo e muitos autoantígenos testiculares parecem não estar completamente protegidos do sistema imune. As células da linhagem espermatogênica são grandes imunógenos, o que é evidenciado pela alta incidência de anticorpos supressores de espermatozoides em um a cada 200 homens no mundo (BAKER et al., 1983; LENZI et al., 1997). Na maioria dos casos, a fuga de espermatozoides do trato reprodutor ocorre devido à má formações congênitas, traumas físicos, inflamações relacionadas a infecções ou intervenções cirúrgicas levam à formação de anticorpos anti-espermatozoides (LINNET, 1983; TUNG, 1987). Como os autoantígenos testiculares e espermáticos apresentam grande sensibilidade aos ataques imunológicos, o sistema genital masculino proporciona um ambiente imunológico único para o espermatozoide. Dessa maneira, as respostas imunes no microambiente testicular induzem à supressão das respostas mediadas por células antígeno específicas, favorecendo a tolerância imunológica (HEDGER, 2012). Além disso, a BHT contribui para a redução da atividade imunológica contra células da linhagem espermatogênica no compartimento adluminal. A ruptura dessa barreira é crítica para o início de orquite autoimune e para a infertilidade (ITOH et al., 2005; KOHNO et al., 1983; MENG et al., 2011; YULE; TUNG, 1993).

A literatura mostra que infecções sistêmicas podem ter efeitos inibitórios sobre a função do trato genital masculino. De maneira indireta, mediadores inflamatórios como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), óxido nítrico (NO), fator de necrose

tumoral (TNF) e ainda, EROs podem afetar o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular e reduzir a produção de hormônios androgênicos (HEDGER, 2011). Durante infecções, uma das vias que desencadeia a inflamação e a ativação do sistema imune é o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais estão presentes em bactérias, vírus, fungos e protozoários. Este reconhecimento é mediado por receptores específicos, sendo os receptores do tipo Toll (TLR) os melhores caracterizados. Os TLRs são encontrados principalmente em células mieloides (monócitos, macrófagos, células dendríticas), mas também são expressos por células epiteliais como as células de Sertoli testiculares e células do epitélio epididimário (HEDGER, 2011; KAWAI; AKIRA, 2010)

No testículo normal, as células imunes são encontradas exclusivamente no tecido intersticial, zona peritubular e cápsula testicular. Dentre essas células, encontram-se macrófagos residentes, células dendríticas e linfócitos circulantes, com presença variável de mastócitos e eosinófilos, dependendo da espécie (ANTON et al., 1998; WANG et al., 1994)

Sabe-se que a maioria dos macrófagos residentes no testículo possuem atividade pró-inflamatória reduzida, produzindo preferencialmente citocinas imunossupressoras (TGF- $\beta$  e IL-10) e expressando marcadores de superfície compatíveis com o fenótipo alternativamente ativado ou M2 (BRYNIARSKI et al., 2004; MARESZ et al., 2008) Esses macrófagos exercem importante papel na regulação das respostas aos antígenos no ambiente testicular, juntamente com os linfócitos T reguladores (T<sub>reg</sub>), também presentes em quantidade significativa neste órgão (HEDGER, 2011a). A regulação do recrutamento e manutenção de macrófagos testiculares é controlada por células de Leydig, de maneira independente de testosterona (DUCKETT et al., 1997; MEINHARDT et al., 1998; RABURN et al., 1993).

A literatura tem apresentado também o papel imunomediador das células de Sertoli em controlar a imunidade testicular. Dentre eles, estão a produção de proteínas imunorregulatórias como inibidoras do complemento e da atividade de granzima B (LEE et al., 2007; O'BRYAN et al., 1990; SIPIONE et al., 2006); moléculas inibidoras de linfócitos, como ligantes de Fas (CD95L) (BELLGRAU et al., 1996; SANBERG et al., 1997); o receptor co-inibitório B7-H1 (DAL SECCO et al.,

2008) e citocinas imunorregulatória como TGF-  $\beta$  e activina A (OKUMA, 2005; SKINNER; MOSES, 1989; SUAREZ-PINZON et al., 2000).

Em geral, o epidídimo aparenta ser mais susceptível à inflamação e autoimunidade do que o testículo (HEDGER, 2011). Ao contrário do que se observa no testículo, macrófagos e linfócitos são frequentemente observados tanto no epitélio quanto no tecido intersticial epididimário, sendo nomeados em cortes histológicos como células halo (FLICKINGER et al., 1997; SERRE; ROBAIRE, 1999). Em relação às regiões epididimárias, é observado maior número de células dendríticas, macrófagos e células T nas regiões proximais do que nas regiões mais distais do epidídimo (DA SILVA et al., 2011; FLICKINGER et al., 1997; NASHAN et al., 1989). Recentemente, tem-se estudado a enzima imunorregulatória indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), a qual está expressa em alta concentração na cabeça do epidídimo. Foi demonstrado que animais *knockout* para o gene desta enzima apresentaram maior expressão de citocinas pró-inflamatórias nessa região epididimária (BRITAN et al., 2006; JRAD-LAMINE et al., 2011).

Os linfócitos intraepiteliais presentes no epidídimo de ratos, camundongos e humanos são predominantemente células T CD8<sup>+</sup>. A literatura conclui que o aumento no número destes linfócitos pode estar relacionado com distúrbios espermáticos (SERRE; ROBAIRE, 1999). Além disso, é descrito que macrófagos presentes no interior do ducto epididimário possuem função de fagocitar espermatozoides malformados ou senescentes (HEDGER, 2011; ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006).

As citocinas e células do sistema imune possuem importante papel fisiológico no sistema genital masculino, mantendo essa homeostase dos tecidos (FRACZEK; KURPISZ, 2015). TNF- $\alpha$  é secretado por monócitos e macrófagos e desempenha um papel central no início da resposta inflamatória estimulando a liberação de IL-6 por macrófagos e monócitos (HALES; DIEMER; HALES, 1999). Em situação de homeostase testicular, TNF- $\alpha$  é expresso por espermatócitos e espermátides arredondadas, controlando o processo espermatogênico e inibindo a apoptose das células germinativas através do bloqueio da ação do FasL em células de Sertoli (BIALAS et al., 2009; HALES; DIEMER; HALES, 1999; HEDGER; MEINHARDT, 2003). Em contraste, no ambiente inflamatório testicular o aumento de TNF- $\alpha$  está relacionado ao aumento da apoptose devido a sua ligação ao receptor TNFR1 em

células germinativas (PÉREZ et al., 2013b). Além disso, o TNF- $\alpha$  também pode levar a alterações na BHT e conseqüentemente, induzir a perda de células germinativas (ZHANG et al., 2015). Esta citocina ainda pode ter função autócrina sobre as células de Leydig uma vez que estas células também liberam TNF- $\alpha$ , interferindo na esteroidogênese (BIALAS *et al.*, 2009; HEDGER; MEINHARDT, 2003). Além disso, estudo *in vitro* mostrou que o aumento de níveis de MDA, um biomarcador de peroxidação lipídica, em espermatozoides está associado com o aumento de citocinas IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$  (MARTÍNEZ; PROVERBIO; CAMEJO, 2007).

Em testículos, a IL-6 é liberada por macrófagos intersticiais, células de Leydig, células de Sertoli, células germinativas e espermatozoides (POTASHNIK et al., 2005). Esta interleucina parece ter um papel importante no desenvolvimento, crescimento, proliferação e diferenciação do testículo além de apresentar ação autócrina/parácrina na regulação da espermatogênese e esteroidogênese (POTASHNIK et al., 2005; RIVAL et al., 2006). Durante a inflamação a produção de IL-6 é aumentada devido à infiltração de células inflamatórias no testículo, e assim como o TNF- $\alpha$ , este aumento está associado a perdas de células germinativas no epitélio seminífero devido ao rompimento da BHT (PÉREZ et al., 2013a).

A IL-10 é uma das mais importantes citocinas anti-inflamatórias do sistema imunitário dos mamíferos (BIALAS et al., 2009). No sistema genital masculino, a IL-10 é liberada por macrófagos M2 e é responsável por inibir o reconhecimento de antígenos por linfócitos T (BHUSHAN et al., 2016; BIALAS et al., 2009). Além disso, foi identificado que essas citocinas também são produzidas por células epiteliais epididimárias, levando à supressão de células T e à conseqüente proteção da destruição imune de autoantígenos espermáticos (VERAJANKORVA et al., 2002)

A diferença entre a distribuição de células imunes e citocinas no testículo e no epidídimo aponta para a existência de um microambiente imunológico característico em cada órgão, sendo que a manutenção destes microambientes é fundamental para a qualidade espermática.

#### 1.4 SISTEMA GENITAL MASCULINO E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é considerado uma importante condição fisiopatológica que pode promover uma variedade de desordens celulares, inclusive morte celular

(MELCHIORRI et al., 1996). Esta condição resulta de um desequilíbrio entre espécies oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), e as espécies antioxidantes. As EROs possuem pelo menos um elétron desemparelhado, sendo agentes oxidantes gerados a partir do metabolismo do oxigênio. Devido ao seu elétron desemparelhado eles são capazes de formar moléculas altamente reativas (HENKEL, 2011; MIRANDA-VILELA et al., 2010). As EROs são representadas principalmente pelo oxigênio singlet ( $^1\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $^{\cdot}\text{OH}$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), hidroperoxila ( $\text{HO}_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e hidroperóxidos fosfolipídicos (PLOOH) (MELCHIORRI et al., 1996).

Quando encontradas em altas concentrações, as ERO são tóxicas para as células causando danos em diversos tipos de moléculas biológicas (DAMASCENO et al., 2002), afetando a integridade do DNA e levando à peroxidação lipídica e degradação proteica (SUN, 1990). A lipoperoxidação das membranas celulares culmina em alterações em sua estrutura e permeabilidade (MELLO FILHO; HOFFMANN; MENEGHINI, 1984), perdendo a seletividade iônica e liberando conteúdo de organelas, como enzimas lisossomais hidrolíticas. Além disso, esse tipo de reação leva à formação de aldeídos de baixo peso molecular, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinoneal (4-HNE). Tais produtos reagem com proteínas citoplasmáticas, gerando outros produtos tóxicos, frequentemente culminando em morte celular (HERSHKO, 1989). No entanto, em condições fisiológicas as ERO estão envolvidas em processos bioquímicos normais, como controle da proliferação e sinalização celular (FINKEL, 1998).

Existem mecanismos responsáveis por proteger as células de danos oxidativos por radicais livres, conhecidos como antioxidantes. Os elementos antioxidantes podem ser classificados em endógenos não-enzimáticos (vitamina E ou  $\alpha$ -tocoferol, vitamina C ou ácido ascórbico, vitamina A, carotenos, bilirrubinas, ácido úrico e albumina) ou enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (DAMASCENO et al., 2002; NAZIROGLU, 2003).

A geração de ERO nos espermatozoides pode ocorrer de duas maneiras: (1) o sistema nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidase (NADPH oxidase) ao nível da membrana plasmática do espermatozoide; e (2) a reação oxido-redutase

dependente de NADPH a nível mitocondrial, sendo essa a principal fonte de ERO espermática (AGARWAL et al., 2014; VERNET et al., 2001).

O ânion superóxido é formado a partir do oxigênio molecular, pela adição de um elétron de forma espontânea, principalmente através da cadeia respiratória da membrana mitocondrial (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Essa é uma das principais EROs geradas pelos espermatozoides (AITKEN et al., 1995). Os espermatozoides expressam uma série de enzimas redox durante todo seu desenvolvimento no testículo e epidídimo, e utilizam sua capacidade antioxidante desde o epidídimo até o trato genital feminino.

Além disso, o plasma seminal está entre os fluidos corporais mais enriquecidos em antioxidantes de baixo peso molecular (CONRAD et al., 2015). Durante o processo de capacitação espermática, os espermatozoides passam por um processo de estresse oxidativo devido ao aumento na produção de ERO, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (LEWIS; AITKEN, 2001). Essa produção tem um papel fisiológico importante e desempenha controle tanto da capacitação espermática quanto da reação acrossômica (GRIVEAU; RENARD; LANNOU, 1995).

Acredita-se que as EROs induzam a fosforilação de tirosina, sendo um evento bioquímico chave para os processos de capacitação espermática (LEWIS; AITKEN, 2001). Em humanos, o estímulo na produção de EROs melhora a fosforilação da tirosina, enquanto uma redução nesta produção teve efeito oposto (AITKEN et al., 1995). Porém, a geração excessiva de EROs pelos espermatozoides é associada com prejuízos na função destes e com danos ao DNA da linhagem de células germinativas (AITKEN, 1999; SHARMA, RAKESH; AGARWAL, 1996). Estudos sugerem que o aumento em níveis de EROs está relacionado com a diminuição da motilidade espermática (AGARWAL; IKEMOTO; LOUGHLIN, 1994; ARMSTRONG et al., 1999; LENZI et al., 1993), defeito na espermatogênese ou mesmo apoptose através de dano em DNA (AITKEN et al., 2007). Dessa maneira, a diminuição do potencial de fertilização, aumento de riscos de aborto espontâneos e de anomalias genéticas estão diretamente relacionadas com o aumento dos níveis de estresse oxidativo em espermatozoides (GHARAGOZLOO; AITKEN, 2011).

## 1.5 AGROTÓXICOS E A CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Antes do século XV, a agricultura baseava-se na origem orgânica. Nos séculos XVI e XVII, essa visão orgânica foi substituída pela noção do mundo das máquinas através das novas ideias científicas de Copérnico, Galileu, Newton e Einstein (PINOTTI; SANTOS, 2013). Por volta de 1798, o planeta atingiu um bilhão de pessoas. Enquanto a população mundial crescia em progressão geométrica, o crescimento na produção de alimentos aumentou de forma aritmética, causando uma dívida em alimentos, levando à fome (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Com a Revolução Verde, que ocorreu entre os anos de 1940 e 1970, houve a mecanização rural e uso de fertilizantes e agrotóxicos, levando a um aumento de três vezes na produção de grãos em países desenvolvidos (PINOTTI; SANTOS, 2013). Na década de 70, através da implantação de Planos Nacionais de Desenvolvimento Agrícola e de Fertilizantes e Calcário, o Banco do Brasil concedeu auxílios em financiamento incentivando a “aplicação de tecnologia”, dando início a um novo modelo agrícola baseado no uso de agrotóxicos (ZANIN et al., 1992).

A partir de então, houveram mudanças significativas no processo tradicional da produção agrícola e, conseqüentemente, nos impactos dessa atividade sobre o meio ambiente e a saúde humana (RIBAS; MATSUMURA, 2009). Nesse contexto, os agrotóxicos eram vistos como benéficos para a saúde humana, uma vez que auxiliavam no controle agrícola de pragas e de vetores de doenças vegetais e humanas (COOPER; DOBSON, 2007).

Com o aumento acelerado no uso de agrotóxicos, passou a ser discutido os efeitos desse uso sobre o meio ambiente e a saúde humana. Atualmente, a FAO – Food and Agriculture Organization – apresentou a seguinte definição de agrotóxicos: “produtos químicos ou quaisquer substâncias ou mistura de substâncias destinadas a prevenção, à destruição ou ao controle de qualquer praga, incluindo os vetores de doenças humanas ou de animais, que causam prejuízo ou interferem de qualquer outra forma na produção, na elaboração, na armazenagem, no transporte ou na comercialização de alimentos, para os homens ou os animais, de produtos agrícolas de madeira, ou que podem ser administrados aos animais para combater insetos, aracnídeos ou outras pragas dentro ou sobre seus corpos” (ALONZO; CORRÊA, 2003).

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com seus alvos de ação: inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (controle de plantas invasoras), fumegantes (controle de bactérias presentes no solo), rodenticidas (controle de roedores), dentre outros (RIBAS; MATSUMURA, 2009). Além disso, podem ser classificados também de acordo com a periculosidade ambiental, sendo produtos altamente perigosos ao meio ambiente (Classe I), produtos muito perigosos ao meio ambiente (Classe II), produtos perigosos ao meio ambiente (Classe III) e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Classe IV).

Deve-se levar em consideração que dentre aproximadamente três mil substâncias utilizadas em larga escala no mundo, apenas 40-50 se enquadram nos padrões de potabilidade de água, solo ou ar. Essa situação é alarmante, pois apresenta risco devido à contaminação da cadeia alimentar, que não é avaliada por órgão de controle de qualidade (FONTENELE et al., 2010).

No Brasil, o uso de agrotóxicos é normatizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). A classificação utilizada para avaliar a toxicidade para a saúde humana, em território nacional, é a DL 50 (quantidade de uma determinada substância que é necessária ingerir ou administrar para provocar a morte a pelo menos 50% da população em estudo).

Desde 2008, o país tem ocupado a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos, sendo que mais de 80% dos agricultores brasileiros fazem uso de tais produtos para combater pragas e aumentar a produtividade. De acordo com o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), foram registrados 4.656 casos de intoxicação por agrotóxicos no Brasil, sendo que 128 foram a óbito (SINITOX, 2012). As intoxicações agudas por agrotóxicos são as mais relatadas, afetando principalmente trabalhadores pela via ocupacional.

Além do aumento de danos ambientais e na saúde das pessoas que estão sendo expostas aos agrotóxicos através de alimentos contaminados, os agricultores adultos são o grupo com maior potencial de exposição, assim como seus filhos (PEDLOWSKI et al., 2012). Dessa maneira, a utilização dos agrotóxicos pode ter impacto direto por três vias: (1) via ocupacional, caracterizada pela contaminação dos trabalhadores que manuseiam tais compostos, (2) via ambiental, através da dispersão dessas substâncias pelo meio ambiente (lagos, contaminação atmosférica

e solo) e (3) via alimentar, caracterizada pela contaminação de alimentos que serão ingeridos (MOREIRA et al., 2002).

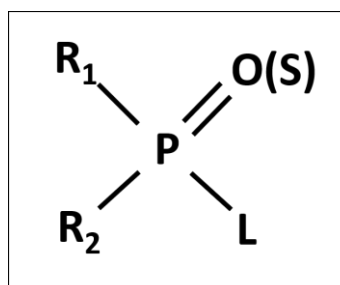
Ribeiro *et al.* (2007) relataram que foram encontrados resíduos de agrotóxicos em amostras de águas subterrâneas em países como Grã-Bretanha, Alemanha, Estados Unidos, Grécia, Bulgária, Espanha, Portugal e Brasil. No solo contaminado, os princípios ativos podem interferir em processos biológicos responsáveis pela oferta de nutrientes, como as bactérias fixadoras de nitrogênio responsáveis pela disponibilização desse mineral às plantas (CARLOS et al., 2013). Os agrotóxicos podem ainda infiltrar no solo e atingir águas subterrâneas utilizadas para o abastecimento de água para uso doméstico (FLORES et al., 2004). Os agrotóxicos podem estar presentes também em estações de tratamento de água urbanas devido ao seu uso não agrícola.

O excesso de aplicação dos agrotóxicos tem levado ao desaparecimento de algumas espécies de insetos com conseqüente aparição de novas pragas, além de levar à resistência de outras espécies a alguns inseticidas, exigindo o desenvolvimento de novos produtos. Além dos efeitos diretos sobre os alvos, os resíduos de agrotóxicos presentes em alimentos consumidos podem ser causa de problemas endócrinos, uma vez que muitos deles possuem atividade hormonal, sendo denominados desreguladores endócrinos (FONTENELE et al., 2010). O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), órgão do Ministério da Saúde, tem se manifestado contra as práticas atuais no uso de agrotóxicos ressaltando seus riscos à saúde, especialmente por estar relacionado com às causas de câncer.

Dentre os agrotóxicos utilizados em larga escala, destacam-se os grupos dos organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretroides (FLORES et al., 2004).

## 1.6 ORGANOFOSFORADOS

Organofosforados (OFs) são compostos químicos derivados dos ácidos fosfórico e tiosfosfórico, destacando-se por sua atividade inseticida utilizados no controle e combate às pragas. São altamente lipossolúveis, com alto coeficiente de partição óleo-água e são rapidamente hidrolisados (ALONZO; CORRÊA, 2003). A Figura 5 apresenta a fórmula estrutural básica dos compostos OFs.

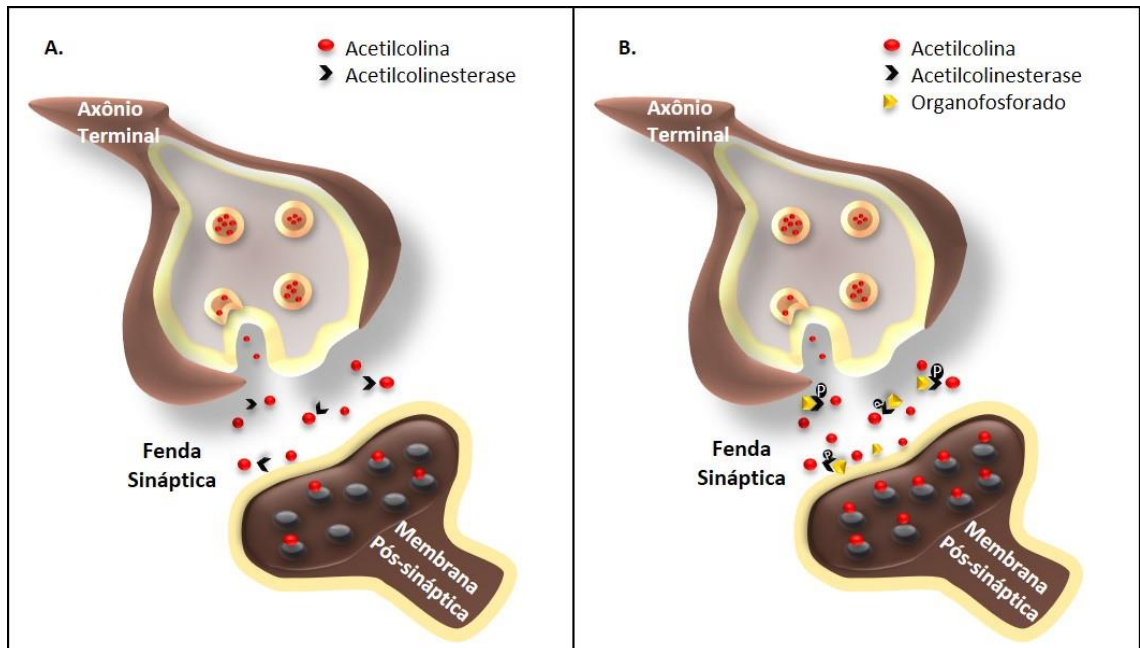


**Figura 5.** Fórmula estrutural básica dos compostos organofosforados. P – fósforo; O – oxigênio; S – enxofre; R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> representam grupos alcoxil; L – halogênios; alquil, aril e heterocíclicos (modificado de dos Santos et al., 2007).

A grande utilização dessa classe de compostos como inseticidas se dá ao fato de suas fortes atividades biológicas e também por serem relativamente instáveis na biosfera. Os OFs surgiram como uma tentativa de substituir os compostos organoclorados, os quais eram apontados por serem grandes causadores de danos ambientais, com alta toxicidade e persistência (COLEONE, 2014).

Estes compostos podem ser absorvidos via dérmica, respiratória ou digestiva, sendo a absorção via oral importante nos casos de intoxicações acidentais, principalmente em crianças. Em adultos, a exposição por via oral ocorre através do manuseio inadequado de instrumentos de pulverização, através do hábito de fumar ou comer durante a aplicação dos OFs ou mesmo consumir alimentos contaminados (LARINI, 1996).

Após serem absorvidos, os OFs passam por metabolismo, principalmente a nível hepático, cujos metabólitos tóxicos agirão inibindo dois tipos de enzimas colinesterases: acetilcolinesterase (AChE), encontrada principalmente em sinapses do sistema nervoso central, parassimpático e em eritrócitos e butilcolinesterase (BChE), encontrada no plasma, intestino, e em menor concentração em outros tecidos (TAYLOR, 1996). Ao serem fosforiladas, as enzimas AChE são irreversivelmente inativadas, levando ao acúmulo de acetilcolina nas sinapses (Figura 6), interrupção da propagação de impulsos elétricos, e conseqüente paralisia e possível morte dos insetos (BRAGA; VALLE, 2007; TAYLOR, 1996). Deve-se ressaltar que os OFs agem da mesma forma para insetos, aves ou mamíferos.



**Figura 6.** Ação dos compostos organofosforados. **A.** Situação fisiológica da acetilcolina ligando-se em receptores da membrana pós sináptica e ação da acetilcolinesterase clivando esse neurotransmissor. **B.** Organofosforado fosforilando e inibindo as enzimas acetilcolinesterase, levando ao acúmulo do neurotransmissor na fenda sináptica. P – fósforo. Fonte: Rafaela Pires Erthal.

O aumento dos efeitos da acetilcolina na fenda sináptica pode explicar a sintomatologia característica da intoxicação aguda por OFs, sendo dividida em 3 fases (KARCZMAR, 1998): (1) colinérgica inicial dura de 24-48 horas, com acúmulo de acetilcolina nas sinapses muscarínicas levando ao aumento de secreções, broncoconstrição, bradicardia, vômitos e aumentando a motilidade intestinal. Em relação às sinapses nicotínicas, ocorre paralisia muscular devido ao bloqueio da despolarização de membrana (KARALLIEDDE; SENANAYAKE, 1989); a fase (2) corresponde à síndrome intermediária, a qual manifesta-se 1-4 dias após a intoxicação aguda e é caracterizada por fraqueza dos músculos do sistema respiratório e paralisia dos nervos cranianos; a polineuropatia tardia caracteriza a fase (3), ocorrendo 14-28 dias após a exposição aos OFs, estando principalmente relacionada com a fraqueza dos músculos periféricos (SENANAYAKE; KARALLIEDDE, 1987).

Em relação à classificação temporal das intoxicações por OFs, Kemple (2001) classificou exposição aguda como aquelas que ocorrem uma ou duas vezes em uma semana ou menos. A exposição crônica se refere a um tempo superior a 10% do

tempo de vida médio de determinada espécie. Apesar da gravidade dos efeitos de intoxicação aguda por OFs, os quais podem até levar à morte, deve-se também levar em conta a intoxicação crônica ou ocupacional, pois essa ocorre de forma silenciosa e sua evolução é muitas vezes despercebida, sem os sinais e sintomas clássicos da crise colinérgica aguda.

### 1.7 MALATION

Sabe-se que doenças causadas pelos vírus da dengue, zica e chikungunya representam um dos maiores problemas de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais, sendo declarada situação de emergência em 2015 (BRASIL, 2015a). O mosquito do gênero *Aedes aegypt* é o vetor de tais doenças, sendo a fêmea mais importante no processo de transmissão. Por conta disso, tem-se tomado medidas nacionais buscando intensificar as ações de mobilização e combate a esse vetor transmissor da dengue, zica e chikungunya em cumprimento a um Plano Nacional de Enfrentamento à Microcefalia (BRASIL, 2015b). Para prevenir ou diminuir a transmissão de tais vírus, medidas tem sido tomadas visando controlar os mosquitos vetores, principalmente as fêmeas, os quais terão o contato com humanos interrompido (WHO, 2009). O combate ao mosquito adulto tem sido feito através do uso de inseticidas químicos.

De acordo com recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), cinco inseticidas foram aprovados para uso em Saúde Pública visando controlar os mosquitos vetores adultos, sendo quatro pertencentes à classe dos piretroides e o malation, pertencente ao grupo dos organofosforados (WHO, 2012). Uma nota técnica apresentada pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC, Fiocruz) apresentou a resistência desses mosquitos à classe dos piretroides e forneceu embasamento para que o Ministério da Saúde substituísse tal classe de compostos pelo malation, como forma de controle de mosquitos adultos a partir de 2009 (BRASIL, 2016a). Dessa maneira, pessoas que vivem em áreas onde o malation é pulverizado visando o controle de mosquitos estão altamente expostas ao inseticida malation (ATSDR, 2003).

Além disso, o uso de malation é indicado pela Anvisa para uso em aplicação foliar em culturas de alface, algodão, berinjela, brócolis, cacau, café, citros, couve, couve-flor, feijão, maçã, morango, pepino, pêra, pêssego, repolho, soja e tomate. O

órgão ainda prevê a aplicação em arroz, feijão, milho, sorgo e trigo armazenados (ANVISA, 2012).

O malation destaca-se por ser utilizado nas mais variadas situações, seja em ambiente urbano ou rural, visando a erradicação de insetos, formigas ou piolhos. Seu nome químico é O,O-dimetil-ditiofosfato de dietil mercaptosuccinato (EPA, 2006). Quando puro, encontra-se no estado líquido e amarelado. É pouco solúvel em água e solúvel na maioria dos compostos orgânicos, como álcool, éster, cetona, éter e hidrocarbonetos aromáticos. A meia vida (taxa de hidrólise) em pH 7,4 e 37,5° C é de aproximadamente 32 horas (EPA, 2006).

Na opção comercial, pode ser encontrado de diversas formas: líquidos oleosos ou viscosos, pouco densos, de cor e cheiros variáveis, incolores ou coloridos, sendo empregado em diversas concentrações (POSSAMAI, 2005). Tem sido utilizado na agropecuária e saúde pública como forma de controle de vetores ou mesmo na forma de uso domiciliar (AHMED et al., 2000).

Quando o malation é introduzido ao meio ambiente através do processo de pulverização, seja em culturas ou áreas residenciais, as gotas do composto no ar aderem ao solo, plantas, água ou superfícies artificiais. Apesar de a maioria desse composto permanecer em áreas de aplicação, uma parte pode mover-se devido às ações dos ventos e chuvas. Ele será então convertido em outros compostos químicos através da ação da água, luz solar e bactérias encontradas no solo e na água (ATSDR, 2003).

O malation destaca-se por sua alta eficácia como inseticida e baixa toxicidade em mamíferos quando comparado a outros OFs. No entanto, excipientes e impurezas presentes nas formulações comerciais podem apresentar maior toxicidade (MARONI et al., 2000; MEINKING et al., 2004). A dose letal 50 (DL<sub>50</sub>) do malation administrado via oral a ratos varia entre 1500 e 2000 mg/kg (U.S. EPA, 2000). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o malation pertence à classe III (moderadamente tóxico) da classificação de pesticidas segundo sua periculosidade. No entanto, esses parâmetros podem não representar os efeitos de exposições crônicas, como câncer, defeitos de nascimento e toxicidade reprodutiva (ATSDR, 2003).

Após ser absorvido, o composto é oxidado no fígado por enzimas pertencentes ao citocromo P-450, dando origem ao metabólito malaoxon, o qual é

responsável pela inibição das ChE e pelos principais efeitos tóxicos observados (U.S. EPA, 2000). Os ratos convertem cerca de 4-6% do malation em malaoxon. Tanto o malation quanto seu metabólito são rapidamente detoxificados por carboxiesterases até derivados mono e diácidos, os quais serão excretados majoritariamente nas primeiras 24 horas pela urina (aproximadamente 84%) e pelas fezes (cerca de 6%) (CARVALHO; RIBEIRO, 2001; U.S. EPA, 2000). A meia vida do malation em sangue de ratos é de 1,4 dias, quando expostos por via oral (ATSDR, 2003).

Estudo mostrou a distribuição do malation para os diversos tecidos humanos (rim, sangue, fígado, coração, baço, cérebro, pulmão e músculos), além de fluidos corporais (sangue e urina) (JADHAV et al., 1992). Nesses casos, o tempo de exposição foi um fator determinante para absorção do composto em tecidos biológicos (BOUCHARD, 2003).

Além do seu mecanismo de ação bem estabelecido, a toxicidade dos organofosforados, incluindo o malation, tem sido relacionada também com a indução do estresse oxidativo por meio da geração de radicais livres e alterações no sistema enzimático de antioxidantes (BROCARD et al., 2005; FORTUNATO et al., 2006; KOVACIC, 2003). As diferentes formas de levar ao estresse oxidativo podem ser explicadas pelas diferenças na forma de exposição ao malation, da distribuição tecidual, idade dos animais (SILVA, 2007) e também das diferentes doses de exposição ao composto.

O malation ainda tem apresentado atividade imunossupressora, podendo causar interferências fisiológicas e patológicas, de função hormonal, metabolismo hepático, além de outros mecanismos imunorregulatórios. Banerjee *et al.* (1998) mostraram a atuação direta ou indireta do inseticida sobre células linfoides, células T, macrófagos e metabolismo de imunoglobulinas. Além disso, estudo apresentou o malation como potente agente genotóxico, podendo estar relacionado com potencial agente mutagênico em células da linhagem germinativa (GIRI et al., 2002).

De acordo com seu mecanismo, o malation interfere na função normal do sistema nervoso, afetando indiretamente muitos órgãos e funções. A exposição a grandes quantidades de malation no ar, água e comidas contaminadas pode causar dificuldade para respirar, aperto no peito, vômitos, cólicas, diarreia, visão turva, salivação, transpiração, dores de cabeça, tonturas, perda de consciência e até

mesmo à morte. Além disso, até o ano de 2003, a Organização Mundial da Saúde relatou que não existiam evidências de que o malation poderia comprometer a capacidade reprodutiva em humanos. (ATSDR, 2003).

A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), órgão da OMS, classifica o malation como provavelmente carcinogênico para humanos, com evidências limitadas em humanos a cânceres de próstata e linfomas não-Hodgkin. Essas evidências foram observadas a partir de pessoas expostas, principalmente trabalhadores rurais, nos EUA, Canadá e Suécia, registrados desde 2001 (WHO, 2015). Além disso, a IARC aponta para o desenvolvimento de tumores em roedores expostos ao composto em estudos experimentais, dano em DNA e cromossomos, além de ser considerado desregulador endócrino (WHO, 2015).

A Organização de Comida e Agricultura das Nações Unidas (FAO) estabelece concentrações de malation que não causam efeitos tóxicos: 29 mg/kg por dia durante dois anos não causou toxicidade ou carcinogenicidade; 400 mg/kg por dia não levou a toxicidade materna em estudo de toxicidade durante o desenvolvimento; 130 mg/kg por dia não causou danos em estudo de toxicidade reprodutiva; 0,3 mg/kg durante 47 dias não alterou parâmetros toxicológicos em humanos. Dessa maneira, a concentração de ingestão diária considerada aceitável para humanos pelo órgão é de 0-0,3 mg/kg de peso corpóreo (FAO, 1997).

Em fevereiro de 2016, a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) reivindicou a imediata suspensão do uso de malation nas campanhas de Saúde pública para controle do *Aedes aegypti*, tanto em nebulização aérea ou cortinados tratados com veneno (mosquiteiros impregnados). O órgão ainda sugere a substituição desses produtos por barreiras mecânicas, limpeza e aspiração, telagem em janelas, entre outras medidas (BRASIL, 2016b).

Os biomarcadores mais específicos para identificação de exposição ao malation são compostos semelhantes e metabólitos em tecidos e fluidos corporais. No entanto, os testes devem ser realizados rapidamente pois seus metabólitos são excretados rapidamente (AKGUR et al., 1999; MORGADE; BARQUET, 1982). Estudos populacionais e de exposições ocupacionais detectaram ácido dicarboxílico malaoxon (DCA), ácido monocarboxílico malathion (MCA), ácido fosforotióico dimetil (DMPT), O,O-dimetil-fosforoditioato (DMPDT) e O,O-dimetilfosfato (DMP) como os principais produtos metabólicos em amostras de sangue e urina (ATSDR, 2003). Em

pesquisa de aproximadamente 7000 pessoas residentes nos EUA conduzido entre 1976 e 1980, 1,1% apresentou concentrações quantificáveis de MCA em urina e <1% apresentou concentrações quantificáveis de DCA (KUTZ et al., 1992), sendo a concentração máxima relatada de 250 µg/L.

Estudo de 5 trabalhadores e 16 residentes expostos ao malation em processos de pulverização no Haiti determinou níveis em urina de MCA em diversos tempos após a exposição, sendo que os residentes não estavam presentes durante a pulverização. Foi observado que os níveis urinários de MCA variaram entre 0,9 e 6,8 mg/L após uma semana de pulverização (WARREN et al., 1985).

Em relação ao diagnóstico de intoxicação por organofosforado, incluindo o malation, pode ser observado pela presença de sinais clínicos e determinação de níveis plasmáticos de colinesterases (ATSDR, 2003). No entanto, a inibição da enzima não é específica para a classe dos organofosforados.

#### 1.8 MALATION E FUNÇÃO REPRODUTIVA

Em 2003, a Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças dos EUA (ATSDR) declarou que as evidências gerais observadas até o momento sugeriam que o malation não apresentava toxicidade para o sistema genital masculino, mas que a falta de estudos de qualidade não permitiam chegar a uma conclusão definitiva (ATSDR, 2003). A partir de então, diversos estudos passaram a ser conduzidos avaliando os efeitos do malation sobre parâmetros reprodutivos.

Slimen et al. (2014), em modelo de exposição aguda ao malation (500 mg/kg p.c. em DPN 45 durante 3 dias), mostrou alterações histopatológicas, bioquímicas e moleculares da função reprodutiva de ratos. Nesse estudo, foi observado diminuição de peso testicular absoluto e relativo de testículos e epidídimos, diminuição de concentrações plasmáticas de testosterona. Foi observado diminuição de motilidade, viabilidade e contagem espermática, além de aumento de espermatozoides anormais. Além disso, foi encontrada alteração em lipoperoxidação e níveis de enzimas antioxidantes de testículos e epidídimos de animais expostos ao malation, com aumento em níveis de MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

O mesmo grupo mostrou alterações histopatológicas, bioquímicas e moleculares na função reprodutiva de ratos expostos ao malation (200 mg/kg p.c.

DPN 21) durante 30 dias (SELMÍ et al., 2015). Nesse estudo, foi observado diminuição da concentração plasmática de testosterona, diminuição de contagem espermática em testículos e epidídimos, de motilidade e viabilidade espermáticas, além de levar a alterações na morfologia espermática. A exposição ao malation induziu o aumento de MDA e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes CAT e SOD em testículos e epidídimos. A histologia testicular foi alterada em animais expostos ao composto, apresentando centros de necrose e edema do tecido intersticial.

Em modelo de exposição a única dose de malation (240 mg/kg) em camundongos, Bustos-Obregón e González-Hormazabal (2003) mostraram redução em epitélio seminífero e diâmetro de túbulos seminíferos 8 dias após a exposição. Esse período corresponde a um ciclo de epitélio seminífero em camundongos. Além disso, 16 dias após exposição ao malation, foi observado diminuição em concentrações plasmáticas de testosterona.

Outro estudo em modelo de exposição única ao malation (250 mg/kg p.c.) em ratos adultos machos apresentou teratozoospermia em animais expostos ao malation 18 dias após a exposição e aumento da contagem espermática. Foi observado aumento de túbulos seminíferos anormais em animais expostos ao composto, com células germinativas presentes no lúmen, diminuição de altura de epitélio seminífero e vacúolos em epitélio seminífero. As células de Sertoli também se mostraram sensíveis à ação do inseticida devido à presença de vacúolos citoplasmáticos presentes nesse tipo celular, o que pode refletir de alterações metabólicas (CONTRERAS; BUSTOS-OBREGÓN, 1999). Espinoza-Navarro e Bustos-Obregón (2014) mostraram diminuição de pesos testicular e epididimário, diminuição da contagem espermática em testículos e epidídimos e aumento de espermatozoides anormais em ratos machos adultos expostos ao malation (170 mg/kg p.c.) durante 13 dias.

Estudo realizados em ratos machos (80-100g) expostos ao malation em diferentes doses durante 60 dias mostrou que o composto (54 mg/kg p.c.) aumenta a taxa de apoptose espermatogênica, o que foi confirmada pelas alterações na expressão proteica de BAX e Bcl-2. Além disso, as atividades de enzimas testiculares, incluindo ACP, LDH e  $\gamma$ -GT foram significativamente alteradas e as

concentrações plasmáticas de LH, FSH e testosterona reduzidas em animais expostos ao malation (GENG et al., 2015).

Choudhary *et al.* (2008) mostraram que malation (50, 150 e 250 mg/kg p.c.) administrado a ratos machos adultos durante 60 dias levou à redução de 80% nos testes de pré e pós-fertilidade após o tratamento. Os pesos testicular e epididimário foram reduzidos em animais expostos às doses de 150 e 250 mg/kg p.c. A exposição ao malation, independente da dose, levou também à diminuição da contagem e motilidade espermática. O perfil bioquímico dos testículos revelou uma diminuição significativa nos conteúdos de ácido siálico e glicogênio, independentemente da dose. Por outro lado, houve aumento significativo na atividade da enzima testicular fosfatase ácida e diminuição da atividade da fosfatase alcalina em ratos expostos ao malation.

Em modelo de estudo *in vitro*, a exposição de testículo de cabra ao malation (100 ng/mL) resultou em redução da atividade das enzimas catalase e SOD 8 horas após a exposição (SHARMA; ALKA, 2013). A qualidade do sêmen humano está diretamente relacionado com a concentração suficiente de antioxidantes e níveis baixos de ERO (ESKENAZI et al., 2005). Quando as ERO estão em níveis elevados, tornam-se extremamente tóxicas para as células, levando à peroxidação lipídica, danos ao DNA e degradação proteica (SUN, 1990).

## 2 JUSTIFICATIVA

Doenças atualmente consideradas de grande problema de saúde pública, como dengue, chikungunya e zica, são causadas por meio do mosquito vetor do gênero *Aedes*, sendo a fêmea da espécie *A. aegypt* a mais importante na transmissão. A prevenção dessas doenças depende do controle dos mosquitos vetores por meio de inseticidas químicos. Uma classe de inseticidas utilizada em larga escala é a dos organofosforados que são inibidores da acetilcolinesterase. A absorção por via oral possui grande importância em intoxicações ambientais principalmente em crianças ou em adultos através do hábito de comer ou preparar alimentos durante o trabalho de aplicação de tais compostos. Dessa maneira, essas exposições são recorrentes e acontecem de maneira não intencional.

Há alguns anos, o inseticida indicado para combate do mosquito *A. aegypt* no Brasil era a deltametrina, mas com o passar dos anos, o mosquito adquiriu resistência contra o mesmo. Como alternativa, tem-se utilizado o organofosforado malation. Estudos mostram que o malation pode causar danos em parâmetros reprodutivos de ratos machos expostos durante a vida adulta. Por outro lado, existem poucos estudos apresentando exposição ao malation durante a peripuberdade. Essa fase trata-se de um período crítico para o desenvolvimento do sistema genital masculino.

Considerando-se que juvenis e adolescentes estão desenvolvendo-se durante esse período de erradicação do mosquito *Aedes aegypt*, sendo expostos ao inseticida malation, o presente estudo tem grande aplicabilidade ao avaliar os efeitos da exposição ao malation em diferentes doses sobre o sistema genital masculino de ratos durante a juventude e peripuberdade. Com os resultados obtidos, pretende-se contribuir para a compreensão da atuação de baixas doses de malation sobre o desenvolvimento pós-natal do sistema em estudo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Diante da falta de informações específicas na literatura e da relevância clínica, social e política do assunto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a exposição a baixas doses de malation durante o período juvenil e peripuberal poderia trazer danos ao desenvolvimento testicular e epididimário de ratos.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a influência do malation sobre o processo de gametogênese e parâmetros espermáticos bem como os aspectos histopatológicos e morfométricos nos testículos e epidídimos;
- Analisar a fisiologia testicular e epididimária através da dosagem de testosterona, cálculo da produção diária de espermatozoides assim como analisar o tempo de trânsito espermático no epidídimo;
- Identificar os possíveis mecanismos de ação do malation através da avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e de perfil inflamatório no testículo e epidídimo
- Contribuir com dados sobre os efeitos e mecanismos de ação da exposição ao inseticida malation sobre o desenvolvimento pós-natal do testículo e epidídimos de ratos

**4 ARTIGO 1**

Exposure to low doses of malathion during juvenile and  
peripubertal periods impairs testicular and sperm parameters in  
rats

Artigo será submetido à revista — “Toxicology”

ISSN: 0300-483X;

F.I. 2017: 3.582

Qualis CAPES 2013-2016 (Medicina II): A2

## **Exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal period impairs testicular and sperm parameters in rats**

Rafaela P. Erthal<sup>1,2</sup>, Larissa Staurengo-Ferrari<sup>2</sup>, Victor Fattori<sup>2</sup>, Flavia A. Guarnier<sup>2</sup>, Rubens Cecchini<sup>2</sup>, Fernando Q. Cunha<sup>3</sup>, Waldiceu A. Verri Junior<sup>2</sup>, Rodrigo R. Pescim<sup>4</sup>, Glaura S. A. Fernandes<sup>1\*</sup>

1 – Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil

2 – Department of General Pathology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil

3 – Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

4 – Department of Statistics, Exact Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil

**\*Corresponding author**

**Tel.:** +55 43 33714417

**E-mail address:** glaura@uel.br (G.S. A. Fernandes)

## **Abstract**

Malathion is an organophosphate insecticide used in agriculture and for controlling vector-borne diseases like Zika disease. Humans can be exposed to malathion by means of ingestion of contaminated food. The juvenile and peripubertal periods are a large window of vulnerability to the action of toxic agents. The aim of the present study was to evaluate the effects of low doses of malathion during the development of testes in the juvenile and peripubertal periods of rats. For this, 45 male Wistar rats (postnatal day (PND) 25) were assigned into 3 experimental groups and treated for 40 days. The animals were daily exposed to malathion 10 mg/kg b.w. (M10 group) or 50 mg/kg b.w. (M50 group) diluted in 0.9% saline. These doses correspond to 0.5 and 2.5% of oral LD50 for adult male rats, respectively. The control group received only the vehicle. On the 40th experimental day, the rats were anesthetized and euthanized. The blood was collected for determination of testosterone concentration. Testes were removed and weighed. Spermatozoa from vas deferens were used to sperm morphological analysis. The testes were used for sperm count, oxidative stress status evaluation, to determine the inflammatory profile and analysis of tissue constitution. The results showed that both malathion doses reduced the sperm count and increased the number of abnormal sperm number. Furthermore, both doses altered spermatogenic process delaying the spermiogenesis and reduced Leydig and Sertoli cell number. The M10 group presented increased IL-10 levels and reduced GSH levels. The M50 group showed an increase in the number of abnormal seminiferous tubules, a decrease in plasma testosterone concentration and an increase in lipid peroxidation. We conclude that lipid peroxidation was the major mechanism by which low doses of malathion affected the testicular development and sperm quality in rats, since seminiferous

epithelium maintenance is testosterone dependent and this androgen was reduced in rats exposed to this insecticide.

Keywords: Testis, sperm, malathion, lipid peroxidation, testosterone

## 1. Introduction

Humans and animals are exposed to environmental pollutants through ingestion of contaminated food, inhalation of contaminated air or skin contact (Nash et al., 2004). In this context, a pollutant often found in environment is malathion that is an organophosphate insecticide with a low level of toxicity to humans compared to the other organophosphate compounds (Maroni et al., 2000).

Malathion is used to control a broad spectrum of insects on a wide range of agricultural food and feed crops (EPA, 2006). Beyond its use in agriculture, the compound is a component of personal hygiene products used for lice control (ATSDR, 2003). Recently, the WHO has recommended malathion powder for malaria vector control by indoor residual spraying. Furthermore, this organization appoints to the implications of the continuous use of malathion for vector control, especially in the control of *Aedes spp* in the context of Zika virus outbreak, also dengue and chikungunya virus which share the same vector (WHO, 2016).

The juvenile and peripubertal periods (PND 22-65 in rats) are a large window of vulnerability to the action of toxic agents. During these periods it has been established the primary androgen production (Podestá et al., 1974), the Leydig cell differentiation and testosterone receptor expression (Benton et al., 1995) and the maturation of hypothalamic-pituitary-gonadal axis (Golub et al., 2008). Thus, these developmental periods are more sensible to toxic agents which may lead to temporary or permanent damage to reproductive system. It has been known that several environmental pollutants may affect the male reproductive health (Chen et al., 2017; Erthal et al., 2017; García et al., 2017).

Evidence shows that malathion may provoke many adverse effects on reproductive system and reducing the quality and quantity of spermatozoa. Slimen et

al. (2014) showed reduction in testis weight, plasma testosterone and an increase in abnormal sperm in adult rats exposed to malathion (500 mg/kg b.w.) for 3 days. The same group reported the same adverse effects and histopathologic alteration in testis after exposure to malation (200 mg/kg b.w., PND 21) for 30 days (Selmi et al., 2015). The toxicity mechanisms of malathion in both studies were related to the oxidative stress and decrease of antioxidants levels.

Moreover, it was showed that adult male rats exposed to malathion (54 mg/kg b.w.) for 60 days had an increase in the rate of apoptosis in spermatogenesis and leads to a reduction in testosterone concentration (Geng et al., 2015). The malathion exposure (50, 150 and 250 mg/kg b.w.) for 60 days lead to reduction of testis weight and sperm count of adult rats (Choudhary et al., 2008).

Since the malathion's oral LD<sub>50</sub> for adult male rats is 5400 mg/kg (EPA, 2000) and the NOAEL (adverse effect level not observed) for reproductive system in rats in relation to developmental toxicity is 130 mg/kg (FAO, 1997), no studies until now show the toxicity of low doses of malathion on testicular tissue during the juvenile and peripubertal periods, which are critical for male reproductive development (Sharpe, 2010).

Although the neurotoxic malathion mechanism is well established by inhibition of acetylcholinesterase enzyme, its toxicity may also be induced by oxidative stress and a disruption in antioxidant enzymes system (Brocardo et al., 2005; Fortunato et al., 2006). Studies valuing other interferers upon reproductive system show that different ways to leads to oxidative stress are due to different exposition via, different doses and exposure periods (Eskenazi et al., 2005; Slimen et al., 2014). Selmi et al. (2015) observed an increase in lipid peroxidation and decrease in antioxidant enzymes both in testes and epididymis after malathion exposure (200 mg/kg, PND

21-51) in mice. In vitro study showed that goat testes exposed for 8 hours to malathion (100 ng/mL) reduced catalase and superoxide dismutase activities, two important antioxidant enzymes (Sharma and Alka, 2013). In this context, it is important to emphasize that the human semen quality is directly related to sufficient antioxidants levels and low oxidative species levels (Eskenazi et al., 2005).

Although there are studies valuing the effect of malathion on reproductive system, the data reported are conflicting depending on the doses or timing of exposure of malathion. The literature does not associate lower doses of the malathion exposure with post-natal testicular development, oxidative stress and the immune system. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of low doses of malathion during the development of testis in the juvenile and peripubertal period of rats.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Animals and experimental conditions**

Juvenile male Wistar rats postnatal day 21 (PND21) were supplied by Biotery of Biological Sciences Centre, State University of Londrina (CCB - UEL) and were acclimated to the new environment at the Laboratory of Toxicology and Metabolic Dysfunction of the Reproduction for 4 days right before the beginning of the experimental period. The animals were kept under recommended conditions at the local animal house. The animals were allocated into polypropylene cages (43 × 30 × 15 cm) with laboratory grade pine shavings as bedding during all the experiment. Temperature and lighting were controlled ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ; 12L, 12D photoperiod, lights switched off at 07:00 pm). Rat chow and filtered tap water were provided *ad libitum*. The weight body of rats and the food and water consumption were measured twice a

week. Animal care and handling procedures were in accordance with EPA guidelines for Reproductive Toxicity Risk and with approval of the Ethics Committee on Animal Use of State University of Londrina (CEUA/UEL protocol number 12305.2016.65).

## **2.2. Experimental design**

The animals were randomly assigned into three experimental groups of 15 animals each: Control (C), Malathion 10 mg/kg body weight (b.w.) (M10) and Malathion 50 mg/kg b.w. (M50). The doses used in the present study are considered to be low doses for rats because these doses are 0.5 and 2.5% of oral LD<sub>50</sub> for adult male rats, respectively (U.S. EPA, 2000). Furthermore, we used malathion at doses lower than the NOAEL (adverse effect level not observed) dose (130 mg/kg b.w.) for reproductive system in rats in relation to developmental toxicity (FAO, 1997). The malathion doses were administered according Geng et al. (2015) which showed reproductive disorders in Wistar rats exposed to malathion 54 mg/kg b.w. during adult life. However, in the current study the experimental period was modified from PND 25 to 65 and the peripubertal period was set according to Ojeda et al. (1980). The animals were exposed to malathion via oral gavage with 10 or 50 mg/kg b.w. diluted in 0.9% saline as vehicle or were vehicle-treated for the control group. All groups were daily treated for forty consecutive days.

## **2.3. Preparation of malathion solution**

Malathion (diethyl-dimethoxyphosphorothioic acid; CAS no. 121-75-5; Cheminova) was obtained from Dominus Quimica (Jandaia do Sul, Brazil). The compound was diluted in 0.9% saline daily.

#### **2.4. Blood, testis and sperm collection**

At the end of experimental period, rats were intraperitoneally anesthetized with a combination of ketamine 75mg/kg b.w. (Sedomin® 10%, Avellaneda, Argentina) and xylazine 10 mg/kg b.w. (Anasedan®, Paulínia, Brazil), weighed and killed by cardiac puncture. Blood was collected for determination of plasma testosterone concentration (n=10 rats per group). Testes were removed and their weights were determined (n=10 rats per group). The testes were used for sperm counts (n=10 per group), the evaluation of lipid peroxidation (n=6 per group), inflammatory profile (n=6 per group) and anatomic analysis (n=5 per group). Spermatozoa from the right vas deferens were used to sperm morphological analysis (n=10 per group).

#### **2.5. Plasma testosterone**

Blood plasma was obtained by centrifugation at 3000g for 15 minutes at 4° C and stored at -20° C until assayed by immunoassay. The total testosterone present in plasma was measured by chemiluminescence (2<sup>nd</sup> Generation Testosterone. Architect System, Abbott, Wiesbaden, Germany), according to the manufacturer's recommendations. The intra-assay coefficient of variation and minimum sensitivity of assay was 4.6% and 0.15 nmol/L respectively.

#### **2.6. Morphometric and histopathological analyses**

The left testes were removed and fixed in methacarn solution (10% acetic acid, 60% methanol and 30% chloroform) for 3 hours at 30°C. The testes were embedded in Paraplast® and sectioned at 5µm. Testes sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and examined under light microscopy for general histopathological and morphometric analysis as described by Favareto et al. (2011).

### **2.6.1 Number of Leydig cells**

The number of Leydig cells nuclei were counted in 10 random fields of interstitial tissue in each testis section per rat under a light microscope at 400x magnification (Guerra et al., 2017).

### **2.6.2 Number of Sertoli cells**

The number of Sertoli cell nuclei was determined in 20 cross-sections of the seminiferous tubules per testis in each rat, under a light microscope at 400x magnification (Nassr et al., 2010).

### **2.6.3 Histopathological analysis in testis**

Histological analysis was performed in 100 randomly selected testicular cross-sections per animal, using an Opton microscope (100x and 400x magnification). The seminiferous tubules were classified into normal or abnormal, according to the appearance of cells present in the seminiferous tubules. Abnormal tubules were subdivided into: immature germ cells in the lumen; acidophilic cells and the presence of vacuolization.

### **2.6.4 Spermatogenesis kinetics**

One hundred random tubular sections per animal were classified into four categories: stages I-VI, VII-VIII, IX-XIII and XIV of the seminiferous epithelium cycle, according to Leblond and Clermont (1952) under a light microscope (Opton) at 100x and 400x magnification.

### **2.6.5 Seminiferous tubule diameters and seminiferous epithelium height**

Ten random testicular cross-sections, per animal, in stage IX of the seminiferous epithelium cycle were examined. Seminiferous tubule diameters were measured using Opton photomicroscope (400x magnification) and BELview software (version 6.2.3.0 for Windows). Likewise, the seminiferous epithelium height was measured using the same tubules as described above. In each seminiferous tubule the mean of four measures for diameters and epithelium height was calculated and these values were used in the statistical analysis aiming comparison between groups.

### **2.7. Daily sperm production**

To evaluate daily sperm production (DSP), the right testes were decapsulated, weighed and homogenized, as described previously (Robb et al., 1978), with some modifications as suggested by Fernandes et al. (2007). After dilution of the homogenate, a small sample volume was transferred to a Neubauer chamber (four fields per animal) for counting of homogenization-resistant spermatids (Stage 19 of spermatogenesis). To calculate DSP, the concentration of spermatids per testis was divided by 6.1, which refers to the number of days for which the mature spermatids are present in the seminiferous epithelium.

### **2.8. Sperm morphology**

Contents of the vas deferens were removed by internal rinsing with 1.0 mL of saline formol 10%. Smears were prepared on histological slides from this solution and observed with an Opton photomicroscope (400x magnification). One hundred random spermatozoa were analyzed per animal. Morphological analysis was

classified into three general categories: normal morphology, head abnormalities (without characteristic curvature or isolated form, i.e., no tail attached) and tail abnormalities (broken, rolled into a spiral and isolated, i.e., no head attached). This analysis was performed as described by Fernandes et al. (2007).

## **2.9. Determination of lipid peroxidation**

The left testis was prepared according to the methods described by Zimiani et al. (2005). Briefly, the tissue was homogenized for 40 s in an Ultraturrax homogenizer (Marconi) containing 50mg mL<sup>-1</sup> tissue in 30mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer and 120mM KCl at pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 11 000g for 15min at 4°C and the supernatant used for the following analysis. Reaction mixtures were placed in luminescence tubes containing homogenate from the testis (50 mg mL<sup>-1</sup>), 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (with 120 mM KCl, pH 7.4) and 6 mM tert-butyl hydroperoxide in a final volume of 1 mL. Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL) was assessed using a luminometer (Promega) with a response range of 300–650 nm (Flecha et al., 1991; Oliveira and Cecchini, 2000). The tubes were kept in the dark until the moment of the assay, which was performed at 30°C. For each animal, a 40-min curve was obtained by interpolation (each point represented the differential smoothing of 600 readings). Results are expressed in relative light units (RLU) per gram tissue. The entire curve was used to determine the lipid hydroperoxides present in the sample.

## **2.10. Inflammatory profile**

### **2.10.1 Myeloperoxidase activity**

Neutrophil recruitment to the testis was determined by the myeloperoxidase (MPO) activity. Myeloperoxidase (MPO) is an enzyme abundantly present in the azurophilic granules of neutrophils that is used as a biochemical marker of neutrophil infiltration into various tissues. Thus, frozen samples were homogenized as described above and centrifuged (16 100g, 2 min, 4°C). The resulting supernatant was assayed spectrophotometrically for MPO activity at 450 nm. Briefly, 5 mL supernatant was mixed with 200 mL of 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.167 mg mL<sup>-1</sup> o-dianisidine dihydrochloride and 0.015% hydrogen peroxide (Bradley et al., 1982; Valério et al., 2009). MPO activity is expressed as the number of neutrophils per mg tissue, read off a standard curve constructed over the range 196–400 000 neutrophils.

### **2.10.2 N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity**

N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) activity at testis was evaluated according to Hohmann et al. (2013). Briefly, the supernatants (20 μL) obtained for the MPO activity assay were placed in a 96-well plate and mixed with K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (80 μL, 50 mM, pH 6.0). The reaction was initiated by the addition of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (100 μL, 50 mM, pH 6.0) containing 4-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminidase substrate (2.24 mM). The plate was incubated at 37°C for 10 min., and the glycine buffer (100 μL, 0.2 M pH 10.6) was added. The enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 400 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland). The results of the NAG activity are expressed as the number of macrophages per mg of tissue using a standard curve of macrophages (196–400,000 cells).

### **2.10.3 Cytokine measurement**

The frozen samples were homogenized in saline and centrifuged (3600 rpm, 4° C, 15 minutes) as previously described by Staurengo-Ferrari et al. (2017). The supernatants were used to determine the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10. The results were expressed as pg per 100 mg of tissue. All measurements were performed using ELISA kits as per manufacturer's instructions.

### **2.11. Statistical analysis**

One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Dunnet's test or the non-parametric Kruskal–Wallis test with the Dunn's post hoc test were used, depending on data distribution, to compare results among malathion-treated groups to control group. The variance among the experimental groups was compared by the Bartlett's test. To evaluate the normal distribution, it was performed Shapiro-Wilk test. When required, data were normalized by box-cox transformation. Variables presenting normal distribution and homogeneity of variance were analyzed by ANOVA with an *post hoc* Dunnet test. Data were presented as the mean  $\pm$  s.e.m. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . The statistical analyses and graph design for results were performed by GraphPad Prism for Windows (version 7.01 – GraphPad Software, La Jolla, California, USA) and InStat (version 3.01 – GraphPad Software, La Jolla, California, USA) programs.

## **3. Results**

### **3.1. Body and testes weight**

The body and teste weight (initial and final) are shown in Table 1. There were no significant differences among the experimental groups for these parameters.

Furthermore, no difference was observed in water and feed consumption (data not shown).

### **3.2. Testosterone concentration**

The plasmatic testosterone concentrations significantly decreased in rats exposure to malathion 50 mg/kg in relation to control animals. Although M10 group decreased about 52% in plasma testosterone concentrations, this difference was not statistically significant. (Figure 1A).

### **3.3. Testicular morphometric and histopathological analyses**

The seminiferous tubular diameters (C=  $261.0 \pm 4.37$ ; M10=  $269.5 \pm 4.84$ ; M50=  $257.2 \pm 4.30$  -  $\mu\text{m}$ ; Media  $\pm$  S.E.M.) and seminiferous epithelium height (C=  $79.4 \pm 1.12$ ; M10=  $75.7 \pm 1.20$ ; M50=  $78.6 \pm 1.38$  -  $\mu\text{m}$ ; Media  $\pm$  S.E.M.) of testes from malathion-treated animals did not differ from the control group. On the other hand, the number of Sertoli (Table 2) and Leydig cells (Figure 1B) decreased in animals exposed to the malathion.

The histopathological analysis (Figure 2) in testis showed that animals treated with malathion showed abnormalities in the seminiferous tubules such as epithelium vacuolization (Figure 2 C and E), immature germ cells in the tubular lumen (Figure 2 D and F) and seminiferous epithelium disruption (Figure 2F). M10 and M50 groups had an increase in the number of abnormal seminiferous tubules compared to control group ( $p < 0.01$ ) (Figure 2 G).

### **3.4. Spermatogenesis kinetics**

The results are given in Table 3. The exposure to malathion 10 mg/kg lead to a significant increase of seminiferous tubules in stages I-VI and XIV. Furthermore, both malathion doses induced a significant reduction in the number of seminiferous tubules in stages VII and VIII whereas the number of seminiferous tubules at stages IX to XIII of spermatogenesis was increased compared to control group.

### **3.5 Sperm parameters: number of spermatozoa, DSP and sperm morphology**

The malathion, in both the doses, decreased the sperm number and daily sperm production (DSP) in the testis when compared with the control group (Table 2). Furthermore, the number of abnormal spermatozoa was significantly greater in M10 and M50 groups compared to control group (Figure 3). The major morphologic abnormalities found in spermatozoa were heads without the characteristic curvature and broken tail; about threefold and fivefold higher, respectively, in the malathion-treated groups.

### **3.6 Oxidative stress status in testis**

Malathion exposure at higher dose (50 mg/kg) induced a significant increase in the CL curve compared to control group reflecting the increased lipid peroxidation in the tissue. The M10 group did not show differences in CL curve in relation to control group (Figure 4).

### **3.7 Inflammatory profile in testis**

There were no significant differences in neutrophil and macrophage recruitment between malathion-treated and control groups (Figure 5 A and B). The

levels of TNF- $\alpha$  (Figure 5 C), IL-1 $\beta$  (Figure 5 D) and IL-6 (Figure 5 E) were similar among the experimental groups. On the other hand, the malathion (10 mg/kg) induced an increase in IL-10 level in the testis compared to control group. The IL-10 level of M50 group did not differ from control group (Figure 5 F).

#### **4. Discussion**

In the present study, we found that malathion acts as an endocrine disruptor for reducing testosterone concentration after M50 oral exposition in rats. The interference by endocrine disruptors during critical development periods can result in permanent alterations in adult life (Chapin, 1997). The testosterone reduction is directly related to decrease in Leydig cells which are the major contributor of androgen synthesis, playing an essential role in testicular development and maintenance of spermatogenesis (Martin, 2016). Leydig cells proliferate from peripubertal to adult stages of development and the adult population of these cells is established by the end of puberty (Teerds and Rijntjes, 2007). The increase in androgen synthesis is critical for normal sexual development and function (Kaukua et al., 2003). Therefore, dysfunction on this cell type may impair the morphophysiology of the male reproductive system such as showed in the present study.

Choudhary et al. (2008) and Geng et al. (2015) showed a maintenance in testosterone concentration in adult male rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> b. w. and 54 mg kg<sup>-1</sup> b. w. of malathion respectively for 60 days. On the other hand, both studies observed a reduction in testosterone concentration when rats received 250 mg kg<sup>-1</sup> b. w. (Choudhary et al., 2008) or 108 mg kg<sup>-1</sup> b. w. (Geng et al., 2015) of malathion for the same period. The different results in relation to the dose of 50 mg kg<sup>-1</sup> b. w.

used in the present study and other similar doses is probably due to the major susceptible of the juvenile and peripubertal periods than the adulthood. Furthermore, rats exposed to malathion during prepubertal period at fourfold dose ( $200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b. w.}$ ) than our study showed a decrease on plasma testosterone concentration (Selmi et al., 2015). In this sense, it was showed that an organophosphorus herbicide, the molinate, inhibit at least one type of esterase in Leydig cell, important in mobilization of cholesterol esters required for testosterone biosynthesis (Jewell and Miller, 1998). Probably, this esterase activity was more susceptible to malathion  $50 \text{ mg/kg}$  than  $10 \text{ mg/kg}$  exposure.

The reduction on sperm count in testis and in sperm daily production is related to alterations on spermatogenesis kinetics, noted by the reduction in stages VII and VIII - which corresponds to seminiferous tubules in spermiation process. It suggests that the toxicant acts retarding the process of spermatogenesis and sperm release, which agree with an increase on tubules on stages IX to XIII which present one generation of spermatids. Corroborating our study, Selmi et al. (2015) using a model of prepubertal exposure to malathion ( $200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b. w.}$  for 30 days) also showed a reduction in sperm count in testis. Furthermore, Seif et al. (2014) observed that adult rats exposed to malathion ( $27 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b. w.}$ , 12 weeks) showed a reduction in sperm count which corroborates the present results.

Once spermatogenesis is regulated by testosterone (Walker and Cheng, 2005), the reduction of testosterone concentration observed in our study reflects the alterations on this process. Furthermore, the Sertoli cells plays some essential functions which are required to occur the spermatogenesis (Foley, 2001). Therefore, alterations in number and function of these cells may compromise the spermatogenesis process (Boekelheid et al., 2005). The reduction in Sertoli cells

number noted in the present study have probably compromised the spermatogenesis which reflected in the sperm counts.

It is well known that levels of androgen receptor (AR) in Sertoli cells increases in stages VI-VII of the spermatogenic cycle and decline after stage VII (Bremner et al., 1994; Vornberger, 1994). Thus, the stage VII is most regulated and sensitive to testosterone (Kerr et al., 1992), what may also explain the reduction of seminiferous tubules in stage VII of spermatogenesis in the present study. Previous study showed that besides germ cells (Mruk and Cheng, 2004), Sertoli cells are also required for retention of Leydig cell population (Rebourcet et al., 2014). Therefore, Sertoli cells may be a direct target of malathion, and the disorders in Sertoli or Leydig cells may impair each other.

Since Sertoli cells are required to development and maintenance of seminiferous epithelium, the reduction observed in this cell type may be related to the presence of abnormalities in seminiferous tubules evidenced in the present study, as vacuoles in epithelium and round cell in the lumen. Corroborating our study, Penna-Videau et al. (2012) noted the presence of vacuoles in the cytoplasm of Sertoli cells in malathion ( $241 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b. w.}$ ) treated mice, 8 days after the toxicant administration. Another study also observed abnormalities in seminiferous tubules after malathion exposure ( $200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b. w.}$ ) for 30 days during prepubertal period (Selmi et al., 2015). Geng et al. (2015) suggests that the effect of malathion on seminiferous tubules are dose-dependent: more severe alterations in seminiferous epithelium, including vacuolization in Sertoli cells cytoplasm, were observed at doses 54 and  $108 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b. w.}$ , whereas  $33.75 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b. w.}$  showed mild testicular changes in adult rats.

As result of affected epithelium seminiferous and spermatogenesis, we showed an increase in the percentage of abnormal sperm. Espinoza-Navarro and Bustos-Obregón (2014) observed teratospermic types in adult male rats treated with 170 mg malathion/kg b. w. via subcutaneous injection for 13 days. Other study showed a reduction in normal sperm forms from pubertal mice after 3 high-doses of malathion (500 mg kg<sup>-1</sup> b. w.) via gavage (Slimen et al., 2014). On the other hand, although Geng et al. (2015) showed an increase in sperm dysmorphology rates in animals exposed to malathion at 54 and 108 mg kg<sup>-1</sup> b. w. for 60 days, this alteration was not observed at 33.75 mg kg<sup>-1</sup> b. w. In contrast to these results, the present study showed an increase in the abnormal sperm even in the lower dose (10 mg kg<sup>-1</sup> b.w.), thus evidencing the more susceptibility of peripubertal period.

Although we found histological alterations after malathion exposure, the testis morphometry kept unaltered. It may also be observed in a study which adult mice were injected with a single dose of malathion (241 mg kg<sup>-1</sup> b. w.) and there was no alteration in morphometric parameters in stage IX seminiferous tubules (Penna-Videau et al., 2012). Furthermore, this unalteration corroborates with the weight testis observed in the present study, which did not differ after both malathion exposures in relation to control group. In contrast, adult male rats showed decrease on testicular weight after malathion exposure at higher dose (170 mg kg<sup>-1</sup> b. w.) during 13 days via subcutaneous route (Espinoza-Navarro and Bustos-Obregón, 2014). It shows that the action of malathion upon testis weight were dose dependent, despite the exposure period.

The literature suggests that the decrease of cellular energy supply in oxidative stress conditions by shutdown mitochondrial function contributes to apoptosis (Kannan and Jain, 2000). It has been shown that malathion may generate oxidative

stress in testis (Sharma and Alka, 2013; Slimen et al., 2014; Selmi et al., 2015) and disbalance the BAX and BCL-2 protein expression which appoints to apoptosis (Geng et al., 2015). Since the Leydig cell number decreased in M50 group, we relate this event to the increased lipid peroxidation observed in the tissue. The oxidative stress may be the major damage mechanism to these cell type, leading to sequential disruptions on testis and sperm. Likewise, Hales et al. (2005) found that oxidative stress was capable of disrupting the steroidogenic capacity of Leydig cells. An in vitro study also showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, an important active reactive oxygen specie, induced apoptosis of Leydig cells and consequently decrease the testosterone production (Gautam et al., 2006).

Furthermore, oxidative stress may also occur in Sertoli cells, which are necessary to spermatogenetic process, being over again the mechanism of toxicity of malathion. Studies valuing malathion exposure in higher doses (500 and 200 mg/kg b.w.) showed oxidative stress in testis and decrease on antioxidant enzymes (Selmi et al., 2015; Slimen et al., 2014). In vitro study also showed that goat testis exposed to malathion (100 ng/mL) showed a reduction in antioxidant profile (Sharma and Alka, 2013). The literature did not hesitate to affirm that oxidative stress may disrupt the capacity of the seminiferous epithelium to produce normal sperm (Naughton et al., 2001), which confirm again the highly vulnerability of testes to oxidative stress. Knowing that oxidative stress is a major factor in the male infertility aetiology (Aitken and Roman, 2008), the increase in lipid peroxidation demonstrated in the present study may direct or indirectly compromise the sperm quality.

On the other hand, the malathion at lower dose (10 mg/kg b.w.) did not lead to oxidative stress and reduction of testosterone concentration. Animals from this group also showed an increase in IL-10 levels, an anti-inflammatory cytokine. It was

reported that IL-10 reduced testicular damage caused by oxidative stress (Ozturk et al., 2014) and Bilbao et al. (2009) reported the ability of IL-10 to increase GSH levels, an important antioxidant enzyme. Thus, IL-10 may mainly acts through indirectly inducing antioxidant property. Furthermore, high levels of IL-10 has been associated with reduced levels of inflammation (Watanabe et al., 2005), corroborating our study that presented normal macrophages activation and pro-inflammatory cytokines levels.

Thereby, the exposure to low doses of malathion during the postnatal development led to a testicular toxicity. It was noted by the alterations in the normal testicular morphology reducing the Sertoli and Leydig cell number and increasing histopathological abnormalities. Thus, the testicular function was compromised altering the spermatogenesis kinetics. As results of these alterations, the sperm count and sperm morphology were also changed, which appoints to malathion, even in lower doses, as a disruptor of testicular development.

## **5. Conclusion**

In conclusion, low doses of malathion impair the testicular development and sperm parameters in rats exposed during juvenile and peripubertal periods. Furthermore, we evidenced that the oxidative stress was the mechanism of toxicity of malathion by reducing testosterone concentration at the higher dose.

## **Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

**Acknowledgements**

The authors are grateful to State to CAPES (Coordinating Body for the Improvement of Postgraduate Studies in Higher Educations) for providing a Master's scholarship to Rafaela Pires Erthal.

## References

- Aitken, R.J., Roman, S.D., 2008. Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1, 15–24.
- ATSDR, Agency for toxic substances and disease registry, 2003. Toxicological Profile for Malathion [WWW Document]. URL <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=522&tid=92> (accessed 12.13.17).
- Benton, L., Shan, L., Hardy, M., 1995. Differentiation of adult Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 61–68.
- Bilbao, F., Arsenijevic, D., Moll, T., Garcia-Gabay, I., Vallet, P., Langhans, W., Giannakopoulos, P., 2009. In vivo over-expression of interleukin-10 increases resistance to focal brain ischemia in mice. *J. Neurochem.* 110, 12–22.
- Boekelheid, K., Johnson, K.J., Richburg, J.H., 2005. Sertoli cell toxicants, In: *Sertoli Cell Biology*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 345–382.
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. *J. Invest. Dermatol.* 78, 206–209.
- Bremner, W.J., Millar, M.R., Sharpe, R.M., Saunders, P.T., 1994. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135, 1227–1234.
- Brocardo, P.S., Pandolfo, P., Takahashi, R.N., Rodrigues, A.L.S., Dafre, A.L., 2005. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology* 207, 283–291.
- Chapin, R.E., 1997. The Effects of Perinatal/Juvenile Methoxychlor Exposure on Adult Rat Nervous, Immune, and Reproductive System Function,. *Fundam. Appl. Toxicol.* 40, 138–157.
- Chen, Q., Yang, H., Zhou, N., Sun, L., Bao, H., Tan, L., Chen, H., Ling, X., Zhang, G., Huang, L., Li, L., Ma, M., Yang, H., Wang, X., Zou, P., Peng, K., Liu, T., Shi, X., Feng, D., Zhou, Z., Ao, L., Cui, Z., Cao, J., 2017. Phthalate exposure, even below US EPA reference doses, was associated with semen quality and

- reproductive hormones: Prospective MARHCS study in general population. *Environ. Int.* 104, 58–68.
- Choudhary, N., Goyal, R., Joshi, S.C., Unit, R.T., 2008. Effect of malathion on reproductive system of male rats Nisha. *J. Environ. Biol.* 29, 259–262.
- EPA, 2000. Office of Pesticides and Toxic Substances. Guid. Regist. Pestic. Prod. Contain. Mal. as Act. ingredient. Washington, D.C.
- EPA, 2006. Office of Pesticides and Toxic Substances. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Malathion, in: EPA 738-R-06-030 Washington, D.C.
- Erthal, R.P., Siervo, G.E.M.L., Silveira, L.T.R., Scarano, W.R., Fernandes, G.S.A., 2017. Can resveratrol attenuate testicular damage in neonatal and adult rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during gestation? *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD17180>
- Eskenazi, B., Kidd, S.A., Marks, A.R., Slotter, E., Block, G., Wyrobek, A.J., 2005. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum. Reprod.* 20, 1006–1012.
- Espinoza-Navarro, O., Bustos-Obregón, E., 2014. Effects of Malathion on Cellularity and Sperm Differentiation in Testis and Epididymis of Adult Rats. *Int. J. Androl.* 32, 119–124.
- FAO, Food and agriculture organization, 1997. Pesticide residues in food : report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Favareto, A.P.A., Fernandez, C.D.B., da Silva, D.A.F., Anselmo-Franci, J.A., Kempinas, W.D.G., 2011. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with Cisplatin at peri-puberty. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 109, 85–96.
- Fernandes, G.S.A., Arena, A.C., Fernandez, C.D.B., Mercadante, A., Barbisan, L.F., Kempinas, W.G., 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod. Toxicol.* 23, 106–12.
- Flecha, B.G., Llesuy, S., Boveris, A., 1991. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 10, 93–100.
- Foley, G.L., 2001. Overview of male reproductive pathology. *Toxicol. Pathol.* 29, 49–

63.

- Fortunato, J.J., Agostinho, F.R., Réus, G.Z., Petronilho, F.C., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., 2006. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotox. Res.* 9, 23–28.
- García, J., Ventura, M.I., Requena, M., Hernández, A.F., Parrón, T., Alarcón, R., 2017. Association of reproductive disorders and male congenital anomalies with environmental exposure to endocrine active pesticides. *Reprod. Toxicol.* 71, 95–100.
- Gautam, D.K., Misro, M.M., Chaki, S.P., Sehgal, N., 2006. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at physiological concentrations modulates Leydig cell function inducing oxidative stress and apoptosis. *Apoptosis* 11, 39–46.
- Geng, X., Shao, H., Zhang, Z., Ng, J.C., Peng, C., 2015. Malathion-induced testicular toxicity is associated with spermatogenic apoptosis and alterations in testicular enzymes and hormone levels in male Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 659–667.
- Golub, M.S., Collman, G.W., Foster, P.M.D., Kimmel, C.A., Rajpert-De Meyts, E., Reiter, E.O., Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., 2008. Public Health Implications of Altered Puberty Timing. *Pediatrics* 121, S218–S230.
- Guerra, M.T., Sanabria, M., Leite, G.A.A., Borges, C.S., Cuciello, M.S., Anselmo-Franci, J.A., Foster, W.G., Kempinas, W.G., 2017. Maternal exposure to butyl paraben impairs testicular structure and sperm quality on male rats. *Environ. Toxicol.* 32, 1273–1289.
- Hales, D.B., Allen, J.A., Shankara, T., Janus, P., Buck, S., Diemer, T., Hales, K.H., 2005. Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1061, 120–134.
- Hohmann, M.S.N., Cardoso, R.D.R., Pinho-Ribeiro, F.A., Crespigio, J., Cunha, T.M., Alves-Filho, J.C., da Silva, R. V, Pinge-Filho, P., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Casagrande, R., Verri, W.A., 2013. 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. *Biomed Res. Int.* 2013, 627046.
- Jewell, W.T., Miller, M.G., 1998. Identification of a Carboxylesterase as the Major Protein Bound by Molinate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149, 226–234.
- Kannan, K., Jain, S.K., 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7,

- 153–163.
- Kaukua, J., Pekkarinen, T., Sane, T., Mustajoki, P., 2003. Sex Hormones and Sexual Function in Obese Men Losing Weight. *Obes. Res.* 11, 689–694.
- Kerr, J.B., Maddocks, S., Sharpe, R.M., 1992. Testosterone and FSH have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis. *Cell Tissue Res.* 268, 179–189.
- Leblond, C.P., Clermont, Y., 1952. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am. J. Anat.* 90, 167–215.
- Maroni, M., Colosio, C., Ferioli, A., Fait, A., 2000. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. *Toxicology* 7, 1–118.
- Martin, L.J., 2016. Cell interactions and genetic regulation that contribute to testicular Leydig cell development and differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* 83, 470–487.
- Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2004. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 25, 747–806.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. *Environ. Health Perspect.* 112, 1725–1733.
- Nassr, A.C.C., Arena, A.C., Toledo, F.C., Bissacot, D.Z., Fernandez, C.D.B., Spinardi-Barbisan, A.L.T., Pires, P.W., Kempinas, W.G., 2010. Effects of gestational and lactational fenvalerate exposure on immune and reproductive systems of male rats. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 73, 952–64.
- Naughton, C.K., Nangia, A.K., Agarwal, A., 2001. Varicocele and male infertility: Part II: Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum. Reprod. Update* 7, 473–481.
- Ojeda, S.R., Andrews, W.W., Advis, J.P., White, S.S., 1980. Recent Advances in the Endocrinology of Puberty. *Endocr. Rev.* 1, 228–257.
- Oliveira, F.J.A., Cecchini, R., 2000. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (l.) chagasi*. *J. Parasitol.* 86, 1067–1072.
- Ozturk, H., Ozturk, H., Terzi, E.H., Bugdayci, G., Duran, A., 2014. Interleukin 10 Reduces Testicular Damage in Experimental Testicular Ischemia/Reperfusion

- Injury. *Urology* 83, 508.e1-508.e6.
- Penna-Videau, S., Bustos-Obregón, E., Cermeño-Vivas, J.R., Chirino, D., 2012. Malathion affects spermatogenic proliferation in mouse . *Int. J. Morphol.* 30, 1399–1407.
- Podestá, E.J., Rivarola, M.A., Jyujó, T., 1974. Concentration of Androgens in Whole Testis, Seminiferous Tubules and Interstitial Tissue of Rats at Different Stages of Development 1. *Endocrinology* 95, 455–461.
- Rebourcet, D., O’Shaughnessy, P.J., Monteiro, A., Milne, L., Cruickshanks, L., Jeffrey, N., Guillou, F., Freeman, T.C., Mitchell, R.T., Smith, L.B., 2014. Sertoli Cells Maintain Leydig Cell Number and Peritubular Myoid Cell Activity in the Adult Mouse Testis. *Plos One* 9, e105687.
- Robb, G.W., Amann, R.P., Killian, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod Fertil* 54, 103–107.
- Seif, M.M., Khalil, F.A., Arab, A.A.K.A., Aziz, A.S.A.-, Donia, M.A.A., Mohamed, S.R., 2014. Protective Effect of *Melissa officinalis* L . against Malathion Toxicity and Reproductive Impairment in Male Rats. *Int. J. Biol. Vet. Agric. Food Eng.* 8, 877–883.
- Selmi, S., Tounsi, H., Safra, I., Abdellaoui, A., Ridha Rjeibi, M., El-Fazaa, S., Gharbi, N., 2015. Histopathological, biochemical and molecular changes of reproductive function after malathion exposure of prepubertal male mice. *RSC Adv.* 5, 13743–13753.
- Sharma, R.K., Alka, G., 2013. Malathion induced changes in catalase and superoxide dismutase in testicular tissues of goat in vitro. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 3, 193–197.
- Sharpe, R.M., 2010. Development and maturation of the normal male reproductive system., In: *Environmental Impacts on Reproductive Health and Fertility*.
- Slimen, S., Saloua, E.F., Najoua, G., 2014. Oxidative stress and cytotoxic potential of anticholinesterase insecticide, malathion in reproductive toxicology of male adolescent mice after acute exposure. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 17, 522–30.
- Staurengo-Ferrari, L., Ruiz-Miyazawa, K.W., Pinho-Ribeiro, F.A., Domiciano, T.P., Fattori, V., Mizokami, S.S., Pelayo, J.S., Bordignon, J., Figueiredo, F., Casagrande, R., Miranda, K.M., Verri, W.A., 2017. The nitroxyl donor Angeli’s salt ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced septic arthritis in mice. *Free*

- Radic. Biol. Med. 108, 487–499.
- Teerds, K., Rijntjes, E., 2007. Dynamics of Leydig Cell Regeneration After EDS, in: *The Leydig Cell in Health and Disease*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 91–116.
- Valério, D.A., Georgetti, S.R., Magro, D.A., Casagrande, R., Cunha, T.M., Vicentini, F.T.M.C., Vieira, S.M., Fonseca, M.J. V., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Verri, W.A., 2009. Quercetin Reduces Inflammatory Pain: Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production. *J. Nat. Prod.* 72, 1975–1979.
- Vornberger, W., 1994. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134, 2307–2316.
- Walker, W.H., Cheng, J., 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130, 15–28.
- Watanabe, M., Kashiwakura, Y., Kusumi, N., Tamayose, K., Nasu, Y., Nagai, A., Shimada, T., Daida, H., Kumon, H., 2005. Adeno-associated virus-mediated human IL-10 gene transfer suppresses the development of experimental autoimmune orchitis. *Gene Ther.* 12, 1126–1132
- WHO, 2016. Use of malathion for vector control: report of a who meeting geneva [WWW Document]. URL [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/207475/1/9789241510578\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/207475/1/9789241510578_eng.pdf) (accessed 01.03.2018).
- Zimiani, K., Guarnier, F.A., Miranda, H.C., Ehara Watanabe, M.A., Cecchini, R., 2005. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. *Nitric Oxide* 13, 196–203.

## Legend of tables

### Table 1

#### Effects of peripubertal exposure to malathion at different doses on body and testis weight

Data are the mean  $\pm$  s.e.m. One-way ANOVA test with a posteriori Dunnet's test. \*\* $p < 0.05$ . M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion

### Table 2

#### Effects of peripubertal exposure to malathion at different doses on sperm counts in the testis and Sertoli cells number

Data are the mean  $\pm$  s.e.m. <sup>1</sup>One-way ANOVA test with an a posteriori Dunnet's test. <sup>2</sup>Kruskal-Wallis test with the post hoc Dunn's test. \*\*\* $p < 0.001$ . M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.

### Table 3

#### Effects of peripubertal exposure to malathion at different doses on spermatogenesis kinetics

Values expressed as mean  $\pm$  s.e.m. One-way ANOVA test with an *a posteriori* Dunnet's test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$  \*\*\* $p < 0.0001$ . M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.

### Legend of figure

**Figure 1 – Plasma testosterone concentration and number of Leydig cells from animals exposed to vehicle or malathion at 10mg/kg or 50 mg/kg. (A) Testosterone concentration (ng/dL). (B) Number of Leydig cells in the interstitium of the testis.**

Values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . One-way ANOVA test, with the *post hoc* Dunnett's test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.

**Figure 2 – Histopathological analysis of seminiferous epithelium in testis from animals exposed to vehicle or malathion at 10mg/kg or 50 mg/kg.**

Photomicrograph of testis section from control (A,B), M10 (C,D) and M50 (E,F) groups. (A and B) Observe the normal aspect of the seminiferous epithelium. (C and E) Shows vacuoles in seminiferous epithelium (arrow). (D and F) Note the presence of round germ cells in testis lumen (arrowhead) and (F) disruption of seminiferous epithelium (asterisk). (G) Abnormal seminiferous tubules. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion. L, lumen; Ep, epithelium; It, interstitial tissue. Hematoxylin and eosin stain. Values expressed as mean  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.001$ . ANOVA test, with the *post hoc* Dunn's test.

**Figure 3 – Sperm morphology from animals exposed to vehicle or malathion at 10mg/kg or 50 mg/kg.**

Values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. \*\* $p < 0.01$ . One-way ANOVA test, with the *post hoc* Dunnett's test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.

**Figure 4 – Oxidative stress status assay in testis from animals exposed to vehicle or malathion at 10mg/kg or 50 mg/kg. *Tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL) was monitored over a period of 40 minutes and plotted in an entire curve of the mean of 2400 readings of emitted light.**

Data are the mean  $\pm$  s.e.m. \*\*\*\* $p < 0.0001$  compared with control. All curves were used for statistical analysis compared by two-way ANOVA test followed by

Dunnett's test. RLU, relative light units. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.

**Figure 5 – Inflammatory profile of testis from animals exposed to vehicle or malathion at 10mg/kg or 50 mg/kg. Number of neutrophils (A) and macrophages (B) in testis measured by myeloperoxidase (for neutrophils) and N-acetyl-b-D-glucosaminidase (for macrophages) activity. Levels of TNF- $\alpha$  (C), IL-1 $\beta$  (D), IL-6 (E) and IL-10 (F).**

Values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.05$ . One-way ANOVA test, with the *post hoc* Dunnett's test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.

**Table 1. Effects of peripubertal exposure to malathion at different doses on body and testis weight**

Parameters	Experimental groups		
	Control (n=10)	M10 (n=10)	M50 (n=10)
<b>Body weight (g)</b>			
Initial	52.79 ± 2.23	54.13 ± 2.34	49.79 ± 1.55
Final	264.2 ± 12.78	271.3 ± 5.82	254.9 ± 9.65
<b>Testis weight (g)</b>	1.38±0.04	1.35±0.05	1.28±0.06

Data are the mean ± s.e.m. One-way ANOVA test with *a posteriori* Dunnet's test. \*\*p<0.05. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion

**Table 2. Effects of peripubertal exposure to malathion at different doses on sperm counts in the testis and Sertoli cells number**

	Experimental groups		
	Control (n=9)	M10 (n=9)	M50 (n=10)
<b>Sperm count</b>			
<sup>1</sup> Mature spermatid number (x10 <sup>6</sup> /testis)	120.0 ± 5.69	91.2 ± 4.88 ***	84.4 ± 4.17 ***
<sup>1</sup> Daily sperm production (x10 <sup>6</sup> /testis/day)	19.7 ± 0.93	14.9 ± 0.80 ***	13.8 ± 0.68 ***
<sup>2</sup> Sertoli cells number	28.3 ± 0.40	21.3 ± 0.33 ***	21.1 ± 0.28 ***

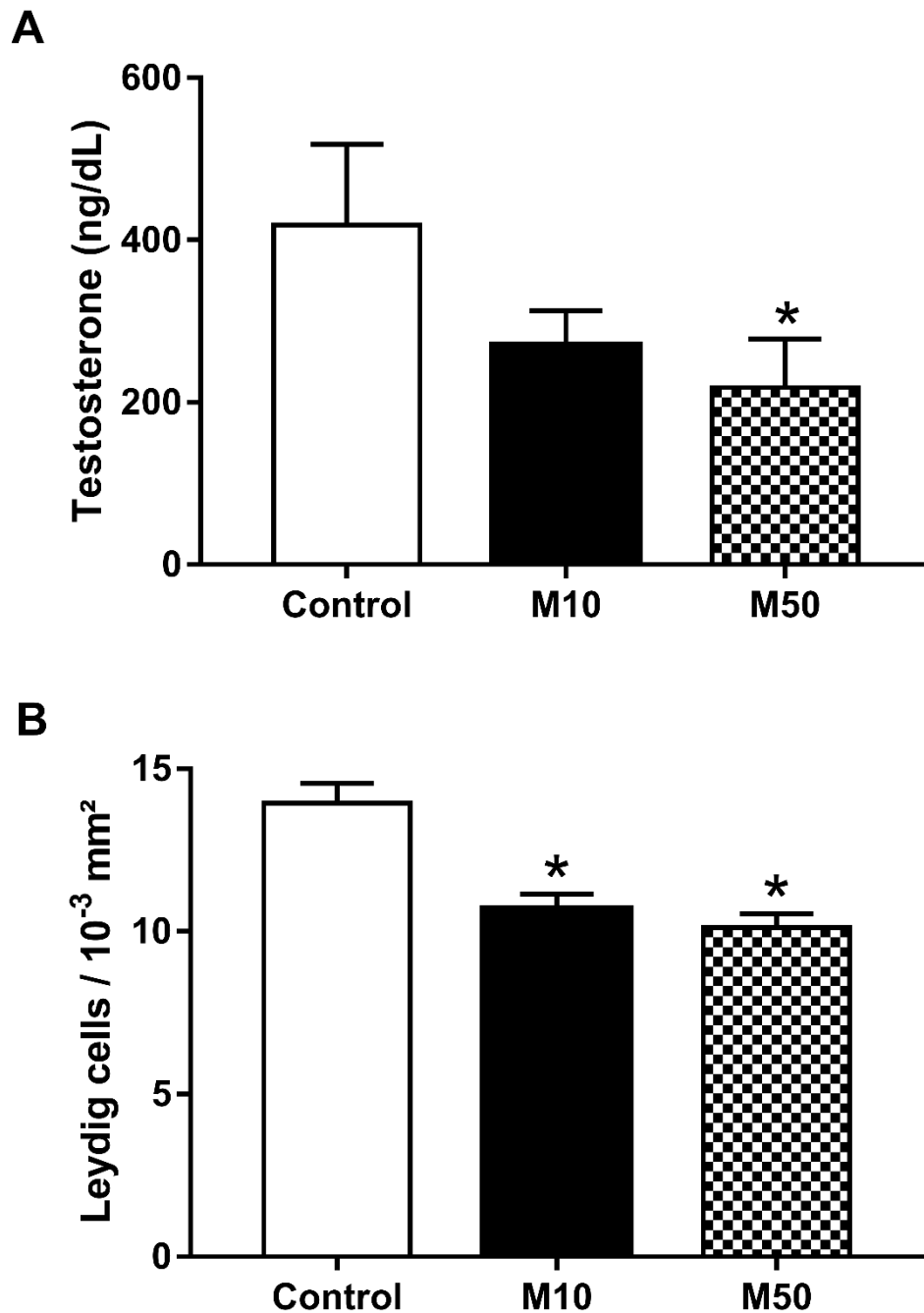
Dare the mean ± s.e.m. <sup>1</sup>One-way ANOVA test with an a posteriori Dunnet's test.

<sup>2</sup>Kruskal-Wallis test with the post hoc Dunn's test. \*\*\*p < 0.001. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.

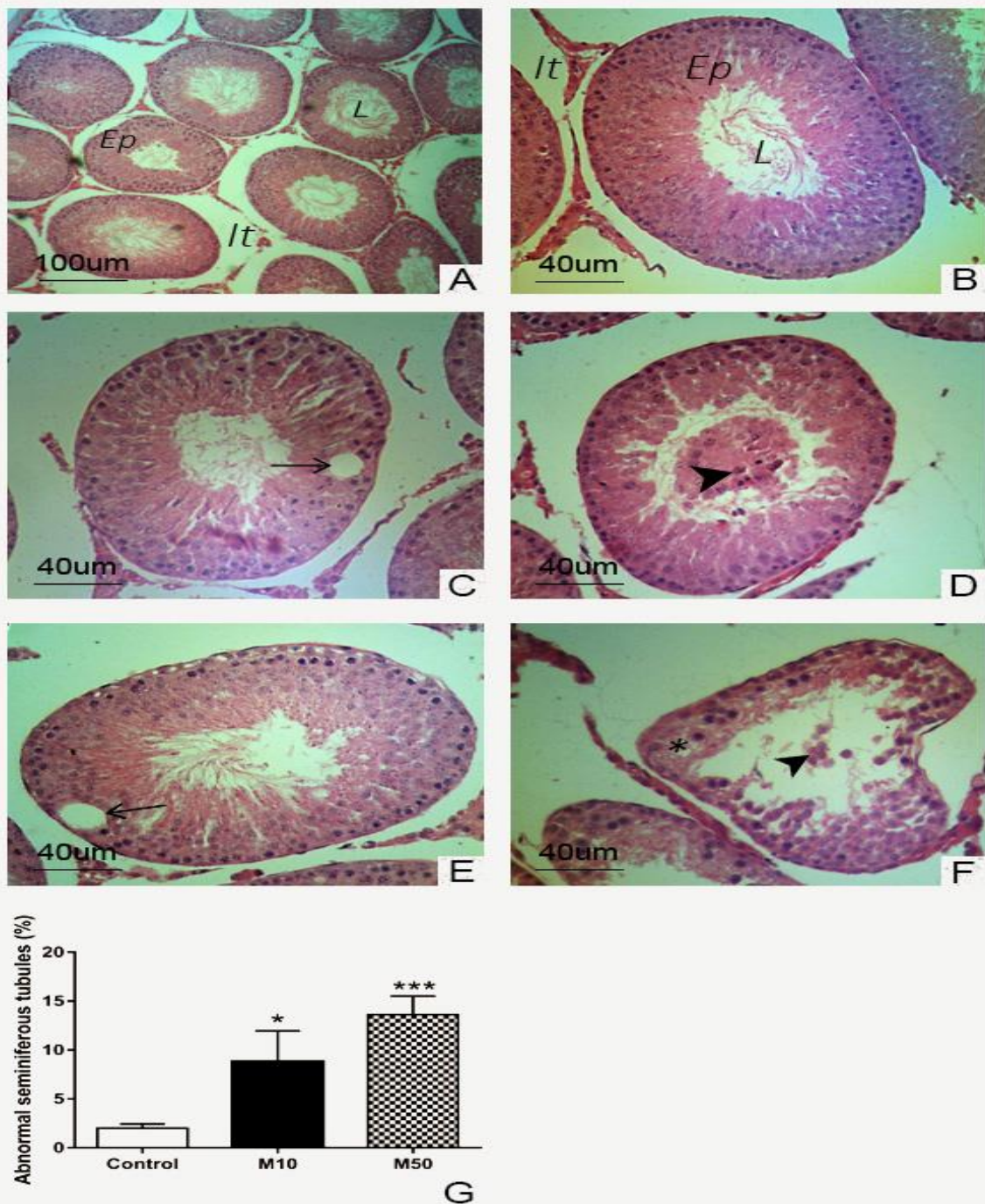
**Table 3. Effects of peripubertal exposure to malathion at different doses on spermatogenesis kinetics**

	Experimental groups		
	Control (n=5)	M10 (n=5)	M50 (n=5)
<b>Stages I-VI</b>	28.20 ± 0.66	35.80±1.96*	33.60±2.77
<b>Stages VII-VIII</b>	47.80±1.46	24.20±4.56***	28.40±2.38**
<b>Stages IX-XIII</b>	22.00±1.38	35.60±4.21*	37.60±2.94**
<b>Stage XIV</b>	2.00±0.63	4.60±0.60*	2.40±0.60

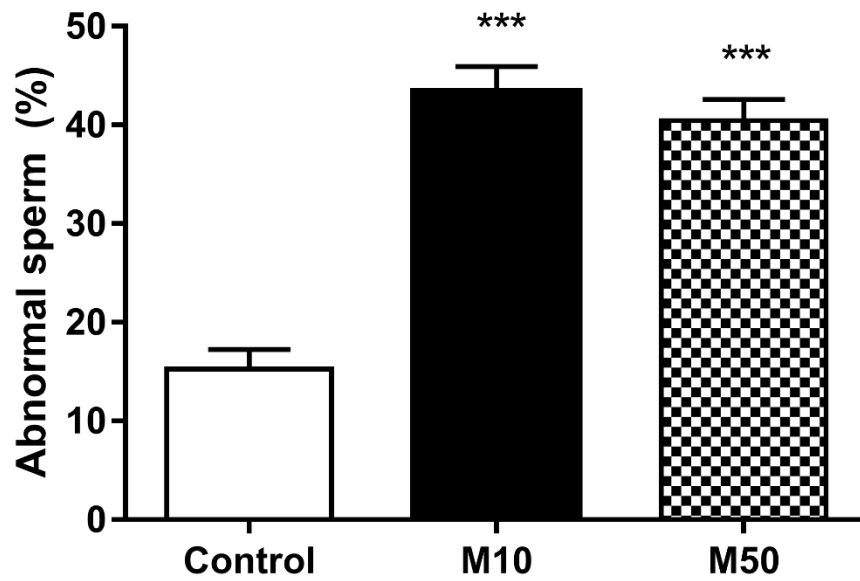
Values expressed as mean ± s.e.m. One-way ANOVA test with an a posteriori Dunnet's test. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001. M10 - rats treated with 10 mg kg-1 malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg-1 malathion.



**Figure 1 – Plasma testosterone concentration and number of Leydig cells from animals exposed to vehicle or malathion at 10mg/kg or 50 mg/kg. (A) Testosterone concentration (ng/dL). (B) Number of Leydig cells in the interstitium of the testis. Values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.05$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . One-way ANOVA test, with the *post hoc* Dunnett's test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.**

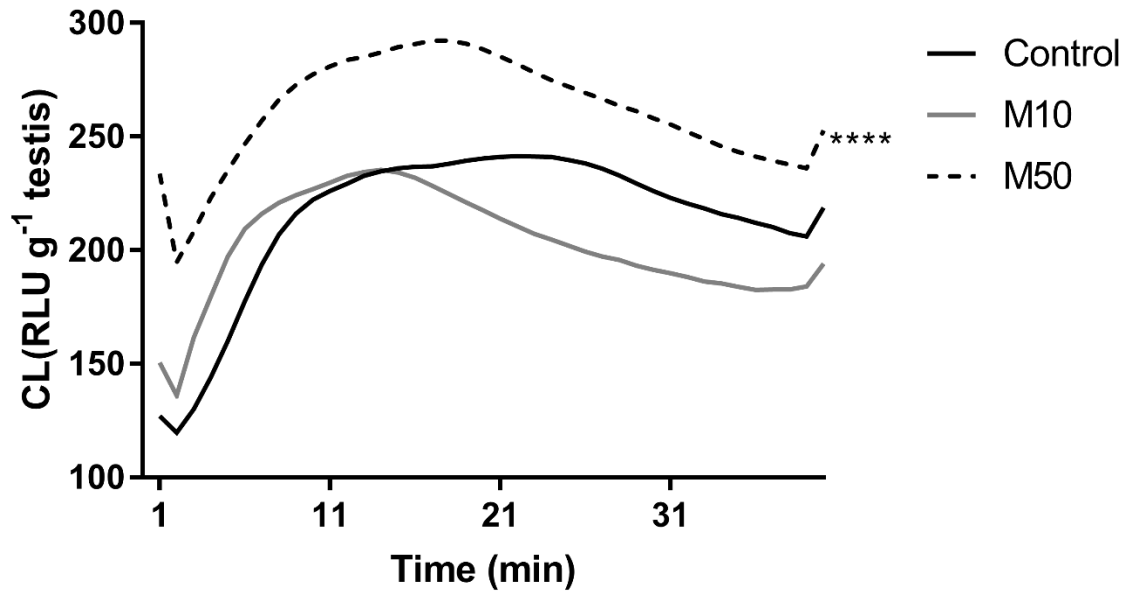


**Figure 2 – Histopathological analysis of seminiferous epithelium in testis from animals exposed to vehicle or malathion at 10mg/kg or 50 mg/kg.** Photomicrograph of testis section from control (A,B), M10 (C,D) and M50 (E,F) groups. (A and B) Observe the normal aspect of the seminiferous epithelium. (C and E) Shows vacuoles in seminiferous epithelium (arrow). (D and F) Note the presence of round germ cells in testis lumen (arrowhead) and (F) disruption of seminiferous epithelium (asterisk). (G) Abnormal seminiferous tubules. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion. L, lumen; Ep, epithelium; It, interstitial tissue. Hematoxylin and eosin stain. Values expressed as mean ± s.e.m. \*p < 0.05 \*\*\*p < 0.001. ANOVA test, with the *post hoc* Dunn's test.



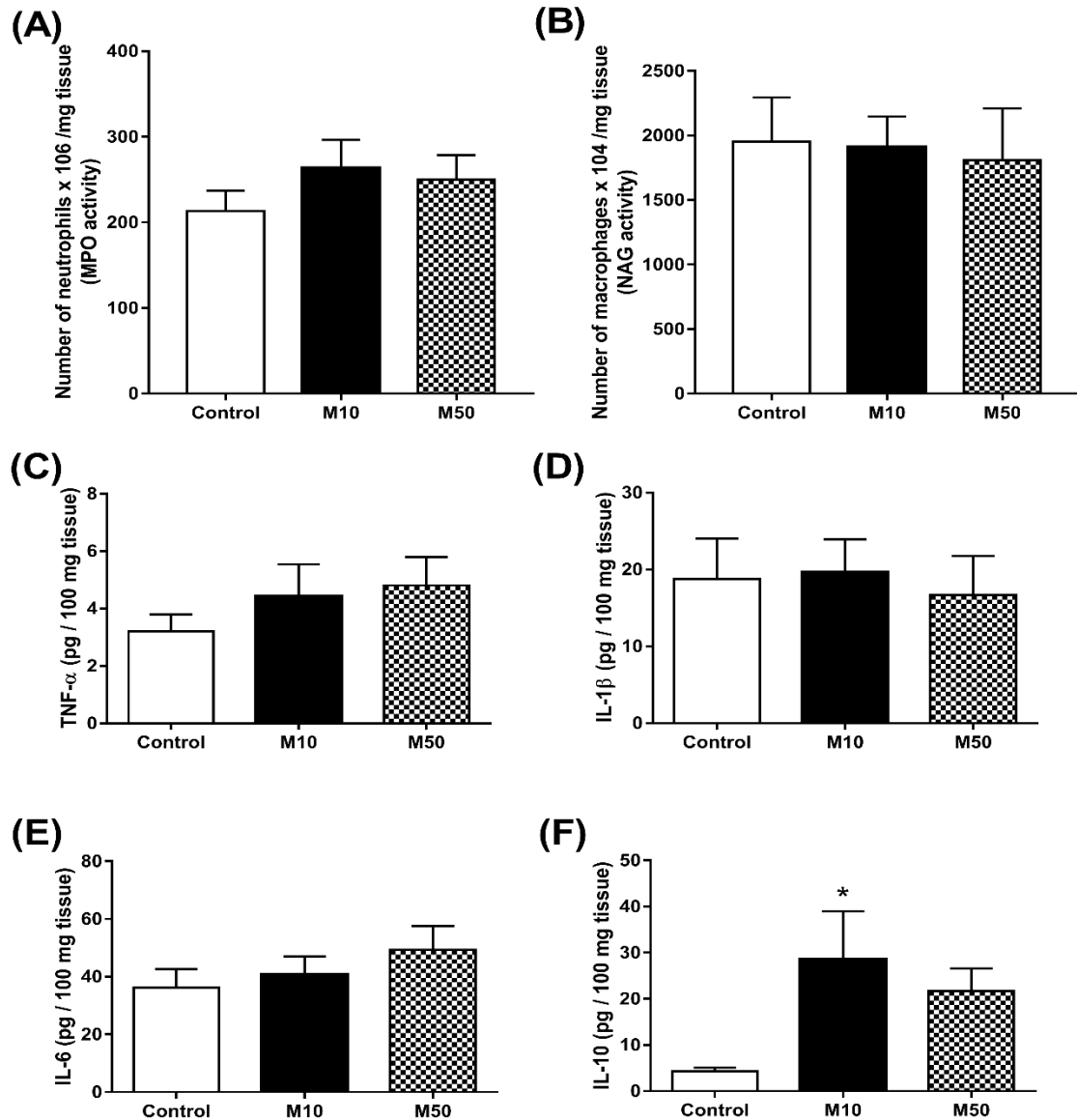
**Figure 3 – Sperm morphology from animals exposed to vehicle or malathion at 10mg/kg or 50 mg/kg.**

Values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m.  $^{**}p < 0.01$ . One-way ANOVA test, with the *post hoc* Dunnett's test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.



**Figure 4 – Oxidative stress status assay in testis from animals exposed to vehicle or malathion at 10mg/kg or 50 mg/kg. *Tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL) was monitored over a period of 40 minutes and plotted in an entire curve of the mean of 2400 readings of emitted light.**

Data are the mean  $\pm$  s.e.m. \*\*\*\*p < 0.0001 compared with control. All curves were used for statistical analysis compared by two-way ANOVA test followed by Dunnett's test. RLU, relative light units. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.



**Figure 5 – Inflammatory profile of testis from animals exposed to vehicle or malathion at 10mg/kg or 50 mg/kg. Number of neutrophils (A) and macrophages (B) in testis measured by myeloperoxidase (for neutrophils) and N-acetyl-b-D-glucosaminidase (for macrophages) activity. Levels of TNF- $\alpha$  (C), IL-1 $\beta$  (D), IL-6 (E) and IL-10 (F).**

Values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.05$ . One-way ANOVA test, with the *post hoc* Dunnett's test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.

**5 ARTIGO 2**

Epididymis development in rats is impaired after exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal periods

Artigo será submetido à revista — “Toxicology Letters”

ISSN: 0378-4274;

F.I. 2017: 3.858

Qualis CAPES 2013-2016 (Medicina II): A2

**Epididymis development in rats is impaired after exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal periods**

Rafaela P. Erthal<sup>1,2</sup>, Glaucia E. M. L. Siervo<sup>1,2</sup>, Larissa Staurengo-Ferrari<sup>1</sup>, Victor Fattori<sup>1</sup>, Rodrigo R. Pescim<sup>3</sup>, Fernando Q. Cunha<sup>4</sup>, Rubens Cecchini<sup>1</sup>, Flávia A. Guarnier<sup>1</sup>, Waldiceu A. Verri Júnior<sup>1</sup>, Glaura S. A. Fernandes<sup>2\*</sup>

1 - Department of General Pathology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil

2 – Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil

3 – Department of Statistic, Exact Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil

4 Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

**\*Corresponding author**

**Tel.:** +55 43 33714417

**E-mail address:** glaura@uel.br ( G.S. A. Fernandes)

## Abstract

Malathion is an organophosphate pesticide widely used on agricultural feed crops and for vector control of *Aedes aegypti* in outbreak of diseases caused by dengue, chikungunya and zika virus. The humans are exposed to this environmental contaminant through ingestion of contaminated water and food. The juvenile and peripubertal is critical for postnatal development of epididymis, being a large window of vulnerability to toxic agents. Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of malathion on epididymal development during juvenile and peripubertal period of rats. Male Wistar rats were daily exposed to malathion via gavage at doses of 10 mg kg<sup>-1</sup> (M10 group) or 50 mg kg<sup>-1</sup> (M50 group) for 40 days (postnatal day (PND) 25-65). The control group received vehicle (saline 0.9%) under same conditions. On PND 40, the epididymis were removed, weighed and divided into caput/corpus and cauda sections. Sperm from vas deferens were subject to sperm motility analysis. The epididymis were used for sperm count, histopathological and stereological evaluation, determination of inflammatory cell enzymatic profile, cytokine levels and lipid peroxidation. Exposure to malathion 50 mg kg<sup>-1</sup> provoked tissue remodeling in caput and cauda epididymis and an increase in neutrophil and macrophages migration in caput epididymis. The percentage of immotile spermatozoa and the IL-6 level in the caput epididymis was decreased after malathion 10 mg kg<sup>-1</sup> exposure. Furthermore, both doses decreased IL-1 $\beta$  and led to morphological alterations in the same region. These results showed that malathion exposure may impair postnatal epididymal development by alterations of immune system.

Keywords: Epididymis, malathion, cytokines, oxidative stress

## 1. Introduction

It has been known that external factors may impair the epididymal function, especially environmental pollutants (Elzanaty et al., 2006; Ogo et al., 2017; Rignell-Hydbom et al., 2005). Environmental pollution from pesticides is often reported. Through pollution, humans are exposed to pesticide contaminated food, inhalation of contaminated air or skin contact (Nash et al., 2004). Malathion is an organophosphate pesticide widely used on agricultural food and feed crops (EPA, 2006), to treat head lice on humans (ATSDR, 2003) and lately, for vector control, especially *Aedes* spp, in outbreaks of disease caused by dengue, chikungunya and zika virus (WHO, 2016).

In 2003, The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) suggested that malathion did not show toxicity to male reproductive system (ATSDR, 2003). However, studies have shown that malathion in higher doses than the present study decreased epididymis weight (Choudhary et al., 2008; Espinoza-Navarro and Bustos-Obregón, 2014; Slimen et al., 2014), sperm motility (Choudhary et al., 2008; Slimen et al., 2014; Selmi et al., 2015), sperm count in epididymis (Choudhary et al., 2008; Espinoza-Navarro and Bustos-Obregón, 2014; Slimen et al., 2014; Selmi et al., 2015) and altered oxidative status (Slimen et al., 2014; Selmi et al., 2015) in epididymis of adult or prepubertal animals.

During juvenile and peripubertal period (PND 22-65 in rats), occurs the maturation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis and the beginning of the reproductive cycle (Ojeda et al., 1980). Furthermore, between PND 16 and 44, the narrow and columnar epididymal cells differentiates, followed by an expansion period (Sun and Flickinger, 1979). Between PND 49 and 63, occurs the first increasing on

epididymal weight (Scheer and Robaire, 1980). Thus, this period is a window of major susceptible to toxic agents to epididymis.

It has been estimated that about 7% of cases of male infertility have an inflammatory involvement, including epididymitis (Schuppe et al., 2008; Weidner et al., 2002). However, the relation between male reproductive system and immune system is poorly understood (Hedger, 2011), including after malathion exposure. Lasram et al. (2014), after liver evaluation, showed that malathion exposure (200 mg mL<sup>-1</sup> b.w.; 28 days) in adult male mice increased the number of leukocytes and neutrophils, the pro-inflammatory cytokines levels (IL-1 $\beta$ , IL-6 and INF- $\gamma$ ), the lipid peroxidation index and decreased antioxidant status in the organ.

According to literature, the major toxicity mechanism of malathion on central nervous system is the lipid peroxidation and the decrease in antioxidant enzymes levels (Brocardo et al., 2005; Fortunato et al., 2006). On male reproductive tract, malathion (200 mg mL<sup>-1</sup> b.w.) also lead to an increase on oxidative stress and a decrease on antioxidant, even in adult or prepubertal animals (Slimen et al., 2015). However, there are no studies relating oxidative stress and reproductive disorders after exposure to lower doses of malathion during juvenile and peripubertal periods.

Although there are some studies assessing the malathion exposure in rats related to damage due to oxidative stress, no study has shown the association between the immune system, oxidative stress and malathion exposure during post-natal epididymal development. Furthermore, the present study used lower doses of malathion exposure in relation to the previous studies of scientific literature. Thus, the aim of the study was to evaluate whether exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal period could impair epididymal development in rats.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Animals and experimental conditions**

Juvenile male *Wistar* rats postnatal day 21 (PND21) and a body weight of around 52 g were provided by the Central Animal House, Londrina State University (CCB - UEL), Paraná, Brazil. The animals were acclimated to their new environment (at the Animal House of Laboratory of Toxicology and Metabolic Dysfunction of the Reproduction) for 4 days right before the experiments commenced. During the experimental period, rats were placed into polypropylene cages (43 × 30 × 15 cm) with laboratory grade pine shavings as bedding and maintained under controlled light condition (12-h light-dark cycle; lights off 07:00 hours) and temperature ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ). Rats had free access to standard commercial laboratory chow and drinking water. Animal care and handling procedures were in accordance with EPA guidelines for Reproductive Toxicity Risk and it was approved by the Ethics Committee on Animal Use of State University of Londrina (CEUA/UEL protocol number 12305.2016).

### **2.2. Experimental design**

The animals were randomly assigned into three experimental groups (n=15 animals per group): a control group (C), one group treated with malathion 10 mg kg<sup>-1</sup> body weight (b.w.) (M10) and another group treated with malathion 50 mg kg<sup>-1</sup> b.w. (M50). The malathion doses were adapted from Geng et al. (2015) and administered from PND 26 to 65. The M10 and M50 doses are stands for 0.5 and 2.5% of oral LD<sub>50</sub> for adult male rats, respectively (EPA, 2000). Therefore, the doses used in the present study are considered to be low doses for male rats. Furthermore, the doses were lower than the NOAEL (adverse effect level not observed) dose (130 mg kg<sup>-1</sup> b.w.) for reproductive toxicology in rats (FAO, 1997). The peripubertal period was

selected according to Ojeda et al. (1980). Thus, the animals were treated orally (gavage) with either 10 or 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion (diethyl-dimethoxyphosphorilthio; CAS no. 121-75-5; Cheminova; diluted in 0.9% saline) or vehicle solution (control group). The groups were treated daily during 40 consecutive days.

### **2.3. Epididymis and sperm collection**

At the end of treatment, rats were intraperitoneally anesthetized with a combination of ketamine 75mg/kg (Sedomin® 10%, Avellaneda, Argentina) and xylazine 10 mg/kg (Anasedan®, Paulínia, Brazil), weighed and euthanized by cardiac puncture. The epididymis were removed and weighed (n=10 rats per group). Right epididymis was used for determining sperm counts (n=10 per group) and histopathological and stereological analysis (n=5 per group). Left epididymis was used in the lipid peroxidation evaluation (n=6 per group) and to determine the inflammatory profile (n=6 per group). Spermatozoa from the left vas deferens were subjected to sperm motility analysis (n=10 per group).

### **2.4. Sperm number and transit time in the epididymis**

To evaluate daily sperm production (DSP), the right epididymis were decapsulated, weighed and homogenized in 5 mL of NaCl 0.9% containing Triton x 100 0.5% (Sigma-Aldrich Co.®) according to the method described by Robb et al. (1978), with adaptations as described by Siervo et al. (2015). After 10-fold dilution of the homogenate, a small sample volume was transferred to a Neubauer chambers, and late spermatozoa were counted (four fields per animal). To calculate sperm transit time through the epididymis, the number of sperm in each portion was divided by the DSP – daily sperm production.

## **2.5. Sperm motility**

Sperm motility was evaluated according to methods described by Siervo et al. (2015). Briefly, the left vas deferens was rinsed with 1.0 mL modified human tubal fluid (HTF) medium with gentamicin (Irvine Scientific) at 34°C-36°C to obtain spermatozoa. A warmed Makler counting chamber (Sefi-Medical, Haifa, Israel) was loaded with 10 µL of the aliquot of sperm solution. Sperm motility was assessed by visual estimation (100 spermatozoa per animal) under a light microscope (Motic) at x100 magnification and was performed by the same person throughout the study. Spermatozoa were classified as mobile or immobile.

## **2.6. Morphometric and histopathological analyses**

The left epididymis was removed and fixed in Metacarn solution (10% acetic acid, 60% methanol and 30% chloroform) for 3 hours at 30°C. The epididymis was embedded in Paraplast® and sectioned at 5µm. The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and examined under light microscopy for histopathological and stereological analysis as described by Favareto et al. (2011).

The histopathological inspection was conducted using epididymal cross-section of caput and cauda of each animal were evaluated qualitatively using an Opton microscope (x100 and x400 magnification). In the stereological analysis, 10 random epididymal cross-sections per animal of caput (Region 2A) and cauda (Region 5A/B) epididymis (Miller and Killian, 1987) were captured using a photomicroscope (Opton) and BELView version 6.2.3.0 (BEL Engineering) for Windows at a magnification of x400 and analyzed. This analysis was performed by means using Weibel's multipurpose graticule with 168 points (Weibel, 1963) to

compare relative proportions among the epididymal components (epithelium, stroma and lumen) in the experimental groups (50 section per group for each epididymal region).

### **2.7. Determination of lipid peroxidation**

The left epididymis was divided into caput and cauda and was prepared according to the methods described by Zimiani et al. (2005). Briefly, the tissue was homogenized for 45 s in an Ultraturrax homogenizer (Marconi) containing 50mg mL<sup>-1</sup> tissue in 30mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer and 120mM KCl at pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 11 000g for 15min at 4°C and the supernatant used for the measurement of tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence. For this, reaction mixtures were placed in luminescence tubes containing homogenate from the caput and cauda epididymis (50 mg mL<sup>-1</sup>) (Siervo et al., 2017), 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (with 120 mM KCl, pH 7.4) and 6 mM tert-butyl hydroperoxide in a final volume of 1 mL. Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL) was assessed using a luminometer (Promega) with a response range of 300–650 nm (Flecha et al., 1991; Oliveira and Cecchini, 2000). The tubes were kept in the dark and in controlled temperature (30°C) until the moment of the assay. For each animal, a 40-min curve was obtained by interpolation (each point represented the differential smoothing of 600 readings). Results are expressed in relative light units (RLU) per gram tissue. The entire curve was used to determine the lipid hydroperoxides present in the sample.

## **2.8 Inflammatory profile**

### **2.8.1 Myeloperoxidase activity**

Neutrophil recruitment to the epididymis was determined by the myeloperoxidase (MPO) kinetic-colorimetric assay (Bradley et al., 1982; Casagrande et al., 2006). Thus, epididymis was separated at the caput/corpus and cauda and the frozen samples were homogenized using a Tissue Tearor (BioSpec, Bartlesville, Oklahoma, USA) in ice-cold  $K_2HPO_4$  buffer (400  $\mu$ L, 50 mM, pH 6.0) containing HTAB (0.5% weight/volume). The homogenates were centrifuged (16 100g, 2 min, 4°C) and the supernatants (30  $\mu$ L) were mixed with  $K_2PO_4$  buffer (200  $\mu$ L, 50 mM, pH 6.0) and hydrogen peroxide (0.05%, v/v) and placed in a 96-well plate. The absorbance was determined after 5 min at 450 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland). MPO activity is expressed as the number of neutrophils per mg tissue, read off a standard curve constructed over the range 196–400 000 neutrophils.

### **2.8.2 N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity**

N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) activity at epididymis was evaluated as previously described by Hohmann et al. (2013). Firstly, the supernatants (20  $\mu$ L) obtained for the MPO activity assay were placed in a 96-well plate and mixed with  $K_2HPO_4$  buffer (80  $\mu$ L, 50 mM, pH 6.0). The reaction started by the addition of  $K_2HPO_4$  buffer (100  $\mu$ L, 50 mM, pH 6.0) containing 4-nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase substrate (2.24 mM). The plate was incubated at 37°C for 10 min., and then, the glycine buffer (100  $\mu$ L, 0.2 M pH 10.6) was added. The enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 400 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland). The results of the NAG

activity are expressed as the number of macrophages per mg of tissue using a standard curve of macrophages (196–400,000 cells).

### **2.8.3 Cytokine measurement**

The frozen samples were homogenized in saline and centrifuged (3600 rpm, 4° C, 15 minutes) according to Staurengo-Ferrari et al. (2017). The supernatants were used to determine the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10. All measurements were performed using ELISA kits as per manufacturer's instructions. The results were expressed as pg per 100 mg of tissue.

### **2.9. Statistical analysis**

The parameters were submitted to the Shapiro-Wilk test for normality and classified into parametric and non-parametric data. The variance among the experimental groups was compared by the Bartlett's test. When required, data were normalized by box-cox transformation. The results from malathion-treated groups were compared to control group by one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Dunnet's test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . The statistical analyses and graph design for results were performed by GraphPad Prism for Windows (version 7.01 – GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Data are presented in the text as the mean  $\pm$  s.e.m..

### **3. Results**

#### **3.1. Weight of epididymis, sperm motility, sperm number and sperm transit time in the epididymis**

Table 1 shows the epididymal weight, sperm motility, sperm number and sperm transit of the caput/corpus and cauda epididymal portions. Exposure to malathion did not alter significantly the epididymal weight in relation to control group. The treatments did not show any alteration in sperm count and transit time in both epididymal regions. On the other hand, the exposition to the lower dose (10 mg kg<sup>-1</sup>) increased the percentage of immobile spermatozoa.

#### **3.2. Histopathological and stereological analyses of the epididymis**

Histopathological analysis (Figure 1) showed the presence of vacuoles (Figure 1 B and C) on epithelium of caput epididymis and of multinucleated cells (Figure 1 B and D) in the same epididymis region after both malathion treatments. On the other hand, cauda region was not susceptible to malathion in this parameter (Figure 1 E-F).

Stereological analysis (Table 2) showed that animals exposed to malathion 50 mg/kg had an increase on percentage of the stromal compartment of caput region and a decrease in lumen compartment of cauda region in relation to control group. The toxicant at the lower dose did not alter the compartments of caput or cauda epididymis.

#### **3.3. Inflammatory profile: MPO and NAG activity and cytokine levels**

The evaluation of MPO and NAG activity (Figure 2) showed that the malathion at dose 50 mg kg<sup>-1</sup> increased the neutrophil (Figure 2A) and macrophage (Figure 2C) recruitment in caput region, whereas the lower dose did not share the same

results. However, both malathion doses did not alter MPO (Figure 2B) and NAG (Figure 2D) levels in cauda region in relation to control group

Figure 3 shows the levels of TNF- $\alpha$  (Figure 3A and B), IL-1 $\beta$  (Figure 3C and D), IL-6 (Figure 3E and F) and IL-10 (Figure G and H). The levels of IL-1 $\beta$  on caput epididymal were reduced in animals exposed to both malathion doses, whereas the IL-6 levels decreased just after exposure to malathion 10 mg kg<sup>-1</sup>. These alterations were not observed in cauda region. IL-10 and TNF- $\alpha$  levels were not altered regard of the doses or epididymal regions.

### **3.4. Oxidative stress in the epididymis**

The lipid peroxidation levels on epididymis regions is presented in the figure 4. Malathion treatments did not alter the chemiluminescence (CL) curves in caput or cauda epididymis when compared to control group. It showed that malathion did not lead to lipid peroxidation in both epididymis regions.

## **4. Discussion**

The present study shows that exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal period impairs epididymal development by increasing inflammatory response.

Due to the immunoprivileged environment of the testes, the epididymis usually presents more susceptibility to inflammatory and autoimmune responses in relation to testes (Hedger, 2011). Studies observed in epididymitis greater number of macrophages and T lymphocytes in proximal epididymal regions than in distal regions of the tissue (Flickinger et al., 1997; Nashan et al., 1989). In our study, the increase in neutrophil and macrophages migration to caput epididymis after

malathion  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  exposure demonstrated that there were some tissue injury and these cells were involved in an inflammatory process. It has been described that macrophages in epididymal lumen have the role to phagocyte abnormal sperm (Hedger, 2011; Robaire et al., 2006). Furthermore, Serre and Robaire (1999) reported that the increase in lymphocytes number specially in proximal epididymis were related to spermatic disturbance in Brown Norway rats. The literature is clear in showing that malathion in higher doses than the present study may lead to alterations in normal sperm morphology (Espinoza-Navarro and Bustos-Obregón, 2014; Selmi et al., 2015; Slimen et al., 2014). From this, the increase on the immune cells on caput epididymis is probably a mechanism to phagocyte abnormal sperm resulted of an altered spermatogenesis and tissue injury.

Previous study from our group (Ogo et al., 2017) showed that the increase in neutrophils and macrophages migration after BPA exposure, a toxicant and environmental contaminant, was associated to tissue changes during epididymal development in peripubertal rats. By the same way, the current study showed that the alterations in epididymal epithelium after both malathion treatments may be related to inflammatory response. On the other hand, although the lower dose of malathion was capable to induce abnormalities in the epididymis caput, it did not increase the neutrophils and macrophages cells, as showed by MPO and NAG analysis. It suggests that the lower dose was less antigenic.

In addition to abnormalities found in epididymis, we found that malathion treatment ( $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b.w.}$ ) lead to a tissue remodeling. Study of Ogo et al. (2017) correlates once again the inflammatory cells migration with the tissue remodeling, an event also observed in the present study. Thus, the malathion at higher dose altered

the inflammatory profile in the epididymis which reflect to the altered epididymal morphology.

Although IL-1 $\beta$  and IL-6 are considered pro-inflammatory cytokines in systemic level, the present study showed a decrease in IL-1 $\beta$  levels in caput epididymis after both malathion treatments and in IL-6 level after M10 treatment. In this context, there is an enzyme, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), highly expressed in caput epididymis by principal and apical cells (Britan et al., 2006). The absence of IDO leads to the higher expression of pro-inflammatory cytokines and Ido1<sup>-/-</sup> deficient mice showed a decrease in white blood cells in epididymal fluid (Jrad-Lamine et al., 2011). From this, the IDO is perhaps highly expressed in the present study as noted by the lower expression of IL-1B and IL-6 at the lower dose, and the increase in leucocytes in caput epididymis.

The decrease in IL-6 level in caput epididymis in M10 group may be associated with the increase in immobile sperm after the same treatment. Lampiao and du Plessis (2008) showed that IL-6 or TNF- $\alpha$  reduced progressive motility. These authors suggest that this sperm parameter reacts in a dose- and time-dependent manner of cytokines. The differences in exposure time and action pathway of malathion may characterize a different immune response in epididymis, which reflects the different associations between IL-6 and sperm motility.

Furthermore, it was reported that IL-6 and IL-1 $\beta$  exert a fundamental role in spermatogenesis, but the role of these cytokines in epididymis remain unclear (Hedger, 2011). In this sense, there are some epididymal proteins belonging to defensin-like family as bin1b (Yamaguchi and Ouchi, 2012) suggested to be involved in the regulation of inflammatory response in epididymis (Fei et al., 2012). Study showed that the expression of IL-1 $\beta$  was decreased in animals overexpressing

mBin1b (Fei et al., 2012). Thus, a possible mechanism to decrease on IL-1 $\beta$  may be the overexpression of Bin1b in defense to malathion damage.

The toxicity after high doses of Malathion is often caused by generation of lipid peroxidation in epididymis which can lead to tissue damage (Selmi et al., 2015; Slimen et al., 2014). In contrast, the present study showed that low doses of malathion were not capable to induce lipid peroxidation. It is well known that oxidative stress conditions trigger endogenous antioxidants aiming the oxidative balance (Checconi et al., 2015). In this context, the IDO is a potent antioxidant scavenger which may be overexpressed, inhibiting the generation of free radicals and the consequent lipid peroxidation (Christen et al., 1990).

In the present study, the unchanged of the epididymal weight, sperm count and sperm transit in epididymis may be associated. However, studies exposing animals to higher doses of malathion than the present study showed reduction in sperm count in epididymis. Selmi et al. (2015) showed a reduction in sperm count per gram of epididymis after malathion exposure (200 mg/kg b.w., PND 21) for 30 days. Espinoza-Navarro and Bustos-Obregón (2014) also showed decrease in sperm count in epididymis in adult rats treated with 170 mg/kg b.w. for 13 days. Thus, it is possible to conclude that the different effects of malathion between our data and previous study are dose-dependent.

## **5. Conclusion**

The results of the present study showed that exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal periods was critical to epididymal development. In a higher dose, these alterations occur through increased neutrophil and macrophage migration and remodeling of epididymal tissue. Furthermore, the

alterations of immune system in epididymal environment are presented as the new findings about malathion action on epididymis.

**Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

**Acknowledgements**

The authors are grateful to State to CAPES (Coordinating Body for the Improvement of Postgraduate Studies in Higher Educations) for providing a Master's scholarship to Rafaela Pires Erthal.

## References

- ATSDR, Agency for toxic substances and disease registry, 2003. Toxicological Profile for Malathion [WWW Document]. URL <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=522&tid=92> (accessed 12.13.17).
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. *J. Invest. Dermatol.* 78, 206–209.
- Britan, A., Maffre, V., Tone, S., Drevet, J.R., 2006. Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res.* 324, 301–310.
- Brocardo, P.S., Pandolfo, P., Takahashi, R.N., Rodrigues, A.L.S., Dafre, A.L., 2005. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology* 207, 283–291.
- Casagrande, R., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Dorta, D.J., dos Santos, A.C., Fonseca, M.J.V., 2006. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 84, 21–27.
- Checconi, P., Salzano, S., Bowler, L., Mullen, L., Mengozzi, M., Hanschmann, E.-M., Lillig, C.H., Sgarbanti, R., Panella, S., Nencioni, L., Palamara, A.T., Ghezzi, P., 2015. Redox Proteomics of the Inflammatory Secretome Identifies a Common Set of Redoxins and Other Glutathionylated Proteins Released in Inflammation, Influenza Virus Infection and Oxidative Stress. *PLoS One* 10, e0127086.
- Choudhary, N., Goyal, R., Joshi, S.C., Unit, R.T., 2008. Effect of malathion on reproductive system of male rats Nisha. *J. Environ. Biol.* 29, 259–262.
- Christen, S., Peterhans, E., Stocker, R., 1990. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 2506–2510.
- Elzanaty, S., Rignell-Hydbom, A., Jönsson, B.A.G., Pedersen, H.S., Ludwicki, J.K., Shevets, M., Zvezday, V., Toft, G., Bonde, J.P., Rylander, L., Hagmar, L., Bonefeld-Jorgensen, E., Spano, M., Bizzaro, D., Manicardi, G.-C., Giwercman,

- A., 2006. Association between exposure to persistent organohalogen pollutants and epididymal and accessory sex gland function: Multicentre study in Inuit and European populations. *Reprod. Toxicol.* 22, 765–773.
- EPA, 2000. Office of Pesticides and Toxic Substances. Guid. Regist. Pestic. Prod. Contain. Mal. as Act. ingredient. Washington, DC.
- EPA, 2006. Office of Pesticides and Toxic Substances. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Malathion, in: EPA 738-R-06-030 Washington, DC.
- Espinoza-Navarro, O., Bustos-Obregón, E., 2014. Effects of Malathion on Cellularity and Sperm Differentiation in Testis and Epididymis of Adult Rats. *Int. J. Androl.* 32, 119–124.
- FAO, Food and agriculture organization, 1997. Pesticide residues in food : report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Favareto, A.P.A., Fernandez, C.D.B., da Silva, D.A.F., Anselmo-Franci, J.A., Kempinas, W.D.G., 2011. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with Cisplatin at peri-puberty. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 109, 85–96.
- Fei, Z., Hu, S., Xiao, L., Zhou, J., Diao, H., Yu, H., Fang, S., Wang, Y., Wan, Y., Wang, W., He, Y., Wang, C., Xu, G., Wang, Z., Zhang, Y., Fei, J., 2012. mBin1b transgenic mice show enhanced resistance to epididymal infection by bacteria challenge. *Genes Immun.* 13, 445–451.
- Flecha, B.G., Llesuy, S., Boveris, A., 1991. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 10, 93–100.
- Flickinger, C.J., Bush, L.A., Howards, S.S., Herr, J.C., 1997. Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat. Rec.* 248, 380–90.
- Fortunato, J.J., Agostinho, F.R., RÉus, G.Z., Petronilho, F.C., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., 2006. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotox. Res.* 9, 23–28.
- Geng, X., Shao, H., Zhang, Z., Ng, J.C., Peng, C., 2015. Malathion-induced testicular toxicity is associated with spermatogenic apoptosis and alterations in testicular

- enzymes and hormone levels in male Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 659–667.
- Hedger, M.P., 2011. Immunophysiology and Pathology of Inflammation in the Testis and Epididymis. *J. Androl.* 32, 625–640.
- Hohmann, M.S.N., Cardoso, R.D.R., Pinho-Ribeiro, F.A., Crespigio, J., Cunha, T.M., Alves-Filho, J.C., da Silva, R. V, Pinge-Filho, P., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Casagrande, R., Verri, W.A., 2013. 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. *Biomed Res. Int.* 2013, 627046.
- Jrad-Lamine, A., Henry-Berger, J., Goubeyre, P., Damon-Soubeyrand, Lenoir, A., Combaret, L., Saez, F., Kocer, A., Tone, S., Fuchs, D., Zhu, W., Oefner, P.J., Munn, D.H., Mellor, A.L., Gharbi, N., Cadet, R., Aitken, R.J., Drevet, J.R., 2011. Deficient Tryptophan Catabolism along the Kynurenine Pathway Reveals That the Epididymis Is in a Unique Tolerogenic State. *J. Biol. Chem.* 286, 8030–8042.
- Lampiao, F., du Plessis, S.S., 2008. TNF- $\alpha$  and IL-6 affect human sperm function by elevating nitric oxide production. *Reprod. Biomed. Online* 17, 628–631.
- Lasram, M.M., Lamine, A.J., Dhouib, I.B., Bouzid, K., Annabi, A., Belhadjhmida, N., Ahmed, M. Ben, El Fazaa, S., Abdelmoula, J., Gharbi, N., 2014. Antioxidant and anti-inflammatory effects of N-acetylcysteine against malathion-induced liver damages and immunotoxicity in rats. *Life Sci.* 107, 50–58.
- Miller, R.J., Killian, G.J., 1987. Morphometric Analyses of the Epididymis from Normal and Vasectomized Rats. *J. Androl.* 8, 279–291.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. *Environ. Health Perspect.* 112, 1725–1733.
- Nashan, D., Malorny, U., Sorg, C., Cooper, T., Nieschlag, E., 1989. Immunocompetent cells in the murine epididymis. *Int. J. Androl.* 12, 85–94.
- Ogo, F.M., de Lion Siervo, G.E.M., Staurengo-Ferrari, L., de Oliveira Mendes, L., Luchetta, N.R., Vieira, H.R., Fattori, V., Verri, W.A., Scarano, W.R., Fernandes, G.S.A., 2017. Bisphenol A Exposure Impairs Epididymal Development during the Peripubertal Period of Rats: Inflammatory Profile and Tissue Changes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*

- Ojeda, S.R., Andrews, W.W., Advis, J.P., White, S.S., 1980. Recent Advances in the Endocrinology of Puberty. *Endocr. Rev.* 1, 228–257.
- Oliveira, F.J.A., Cecchini, R., 2000. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (l.) chagasi*. *J. Parasitol.* 86, 1067–1072.
- Rignell-Hydbom, A., Rylander, L., Elzanaty, S., Giwercman, A., Lindh, C.H., Hagmar, L., 2005. Exposure to persistent organochlorine pollutants and seminal levels of markers of epididymal and accessory sex gland functions in Swedish men. *Hum. Reprod.* 20, 1910–1914.
- Robaire, B., Hinton, B.T., Orgebin-Crist, M.-C., 2006. The Epididymis. *Knobil Neill's Physiol. Reprod.* 1071–1148.
- Robb, G.W., Amann, R.P., Killian, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod Fertil* 54, 103–107.
- Scheer, H., Robaire, B., 1980. Steroid  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -Reductase and 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Rat Epididymis during Development\*. *Endocrinology* 107, 948–953.
- Schuppe, H.-C., Meinhardt, A., Allam, J.P., Bergmann, M., Weidner, W., Haidl, G., 2008. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia* 40, 84–91.
- Selmi, S., Tounsi, H., Safra, I., Abdellaoui, A., Ridha Rjeibi, M., El-Fazaa, S., Gharbi, N., 2015. Histopathological, biochemical and molecular changes of reproductive function after malathion exposure of prepubertal male mice. *RSC Adv.* 5, 13743–13753.
- Serre, V., Robaire, B., 1999. Distribution of Immune Cells in the Epididymis of the Aging Brown Norway Rat Is Segment-Specific and Related to the Luminal Content. *Biol. Reprod.* 61, 705–714.
- Siervo, G.E.M.L., Vieira, H.R., Ogo, F.M., Fernandez, C.D.B., Gonçalves, G.D., Mesquita, S.F.P., Anselmo-franci, J.A., Cecchini, R., Guarnier, F.A., Fernandes, G.S.A., 2015. Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: Influence of lipid peroxidation but not testosterone. *Toxicology* 330, 1–8.
- Siervo, G.E.M.L., Ogo, F.M., Valério, A.D., Silva, T.N.X., Staurengo-Ferrari, L., Alvarenga, T.A., Cecchini, R., Verri, W.A., Guarnier, F.A., Andersen, M.L., Fernandes, G.S.A., 2017. Sleep restriction in Wistar rats impairs epididymal postnatal development and sperm motility in association with oxidative stress.

- Reprod. Fertil. Dev. 29, 1813–1820.
- Slimen, S., Saloua, E.F., Najoua, G., 2014. Oxidative stress and cytotoxic potential of anticholinesterase insecticide, malathion in reproductive toxicology of male adolescent mice after acute exposure. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 17, 522–30.
- Staurengo-Ferrari, L., Ruiz-Miyazawa, K.W., Pinho-Ribeiro, F.A., Domiciano, T.P., Fattori, V., Mizokami, S.S., Pelayo, J.S., Bordignon, J., Figueiredo, F., Casagrande, R., Miranda, K.M., Verri, W.A., 2017. The nitroxyl donor Angeli's salt ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced septic arthritis in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 487–499.
- Sun, E.L., Flickinger, C.J., 1979. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *Am J Anat* 154, 27–55.
- Weibel, E.R., 1963. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.* 12, 131–55.
- Weidner, W., Colpi, G., Hargreave, T., Papp, G., Pomerol, J., 2002. EAU Guidelines on Male Infertility. *Eur. Urol.* 42, 313–322.
- WHO, World health organization, 2016. Use of malathion for vector control: report of a who meeting geneva [WWW Document]. URL [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/207475/1/9789241510578\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/207475/1/9789241510578_eng.pdf) (accessed 1.3.18).
- Yamaguchi, Y., Ouchi, Y., 2012. Antimicrobial peptide defensin: Identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 88, 152–166.
- Zimiani, K., Guarnier, F.A., Miranda, H.C., Ehara Watanabe, M.A., Cecchini, R., 2005. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. *Nitric Oxide* 13, 196–203.

## Legend of figures

**Figure 1. Histopathological analysis of caput and cauda epididymis.** Photomicrograph of caput (A – D) and cauda (E – G) epididymis sections from control (A and E), M10 (B and F) and M50 (C, D and G) groups. A, E, F and G: epithelium, lumen and stroma with normal aspect. B, C and D: presence of vacuoles in the epithelium (asterisk), multi-nucleated (arrow) and round cells (head of arrow) in the lumen. L, lumen; Ep, epithelium; S, strom. Hematoxylin and eosin stain.

### Figure 2. Inflammatory profile of epididymis.

Number de neutrophils (A and C) and macrophages (B and D) in caput (A and B) or cauda (C and D) epididymis. Data are the mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  in relation to control group. One-way ANOVA test, with the post hoc Dunnett's test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion; MPO - myeloperoxidase; NAG - N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase.

### Figure 3. Cytokine levels in the epididymis

Caput (A, C, E, and G) and cauda (B, D, F and H) epididymis from control and malathion-treated rats. (A, B) TNF- $\alpha$ ; (C, D) IL-1 $\beta$ ; (E, F) IL-6 and (G, H) IL-10. Data are the mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  in relation to control group. One-way ANOVA test, with the post hoc Dunnett's test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.

### Figure 4. Chemiluminescence induced by *tert*-butyl hydro peroxide on epididymis

Caput (A) and cauda (B) epididymis. Values expressed as the mean  $\pm$  S.E.M..  $p > 0.05$ . One-way ANOVA test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion; AUC - area under curve.

## Legend of tables

### Table 1

#### **Epididymal weight, sperm motility, sperm count and transit time in epididymis.**

Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M. One-way ANOVA test with *a posteriori* Dunnet's test. \* $p < 0.05$ . Asterisks indicates groups that differ statistically from control group. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion

### Table 2

#### **Epididymal stereological analysis**

Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M. One-way ANOVA test with *a posteriori* Dunnet's test. \* $p < 0.05$ . Asterisks indicates groups that differ statistically from control group. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion

**Table 1. Epididymal weight, sperm motility, sperm count and transit time in epididymis.**

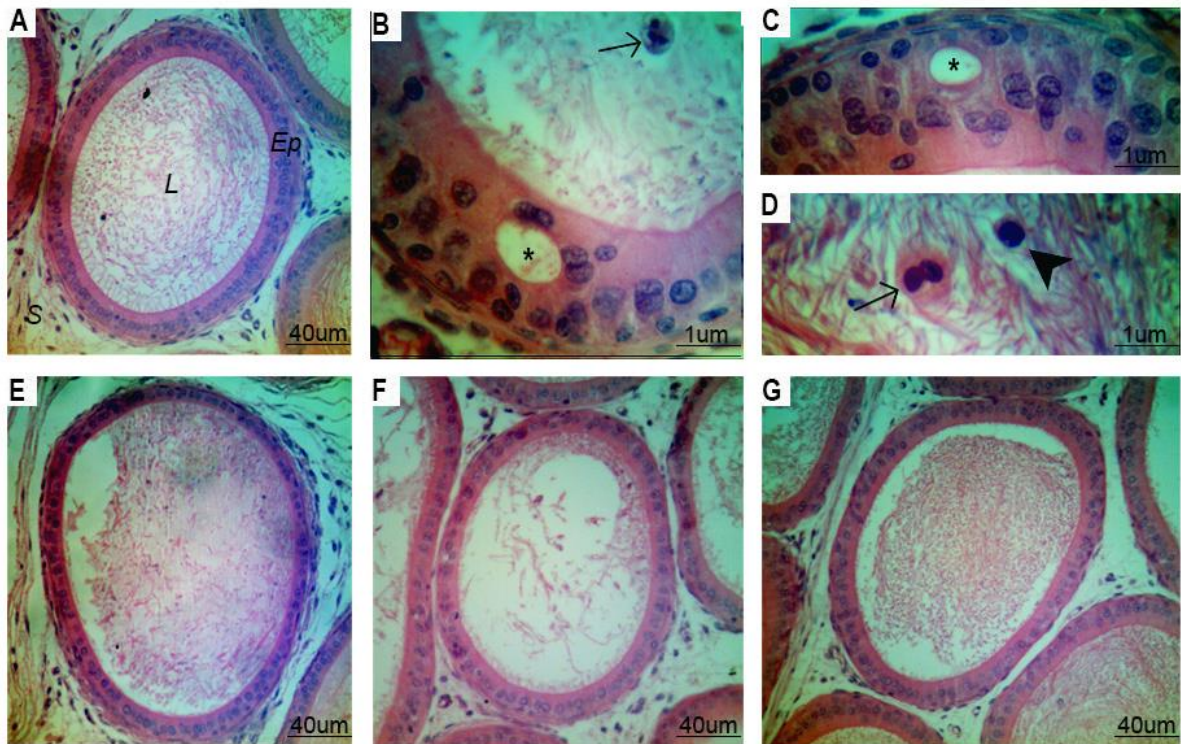
Parameters	Experimental groups		
	Control	M10	M50
<b>Epididymal weight (g)</b>	0.31±0.02	0.29±0.01	0.26±0.02
<b>Sperm motility (%)</b>			
<b>Mobile spermatozoa</b>	71.50 ± 2.31	57.38 ± 4.93*	65.70 ± 3.00
<b>Immobile spermatozoa</b>	28.50 ± 2.31	42.60 ± 4.93*	39.10 ± 3.00
<b>Caput and corpus epididymis</b>			
<b>Sperm number (10<sup>6</sup>)</b>	44.50 ± 5.74	40.70 ± 3.81	34.60 ± 3.18
<b>Sperm transit time (days)</b>	2.60 ± 0.42	2.60 ± 0.22	2.50 ± 0.19
<b>Cauda epididymis</b>			
<b>Sperm number (10<sup>6</sup>)</b>	22.20 ± 4.16	16.30 ± 1.90	14.90 ± 1.27
<b>Sperm transit time (days)</b>	1.00 ± 0.24	1.10 ± 0.20	1.10 ± 0.10

Values expressed as mean ± S.E.M. One-way ANOVA test with *a posteriori* Dunnet's test. \*p<0.05. Asterisks indicates groups that differ statistically from control group. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion

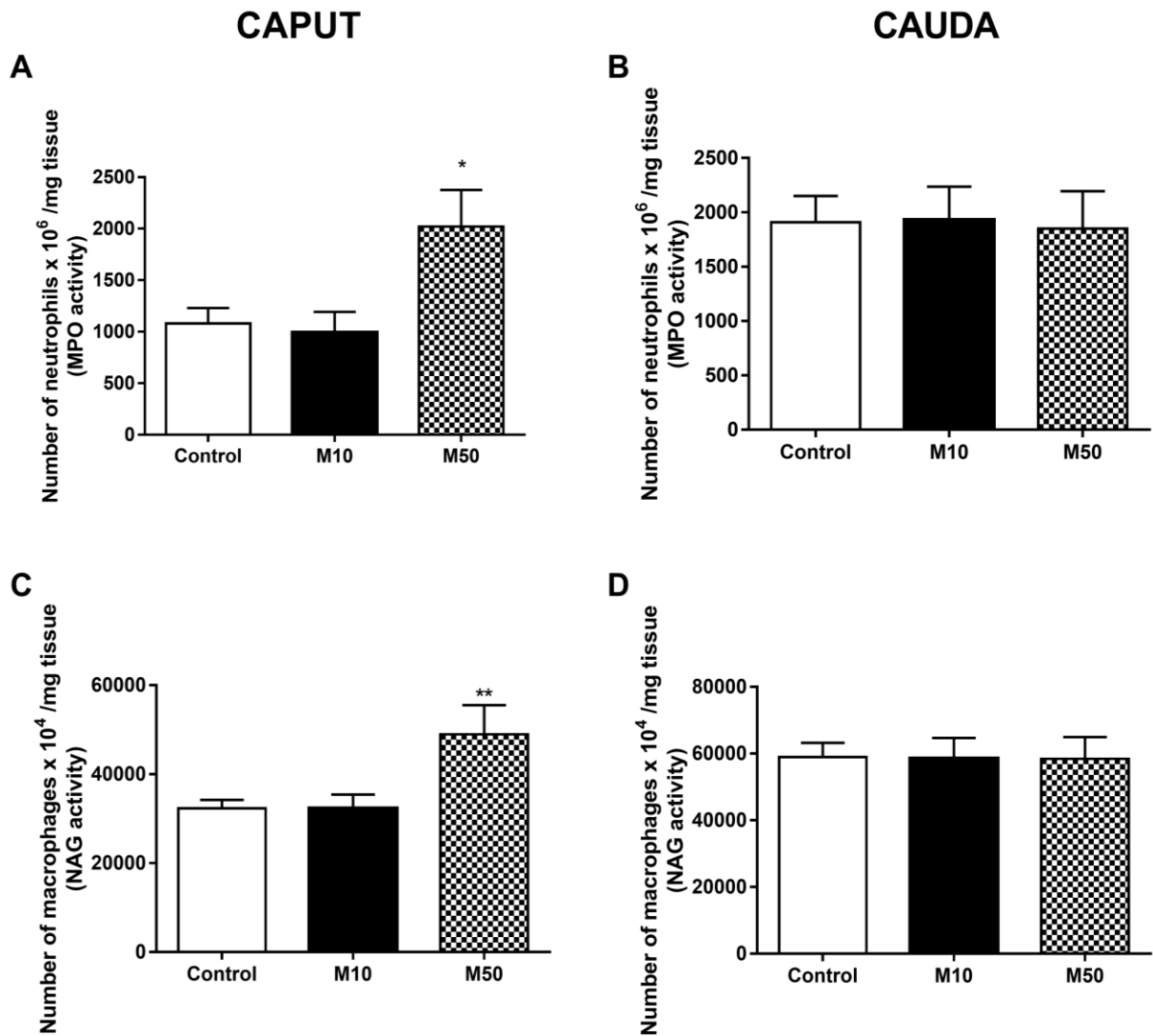
**Table 2. Epididymal stereological analysis**

	Experimental groups		
	Control	M10	M50
<b>Epididymal caput (2A region) (%)</b>			
<b>Epithelial</b>	36.3 ± 0.94	35.7 ± 1.17	37.8 ± 0.87
<b>Lumen</b>	41.8 ± 1.58	35.3 ± 2.11	31.2 ± 1.17
<b>Stroma</b>	21.7 ± 0.97	28.9 ± 1.74	30.9 ± 1.16*
<b>Epididymal cauda (5A/B region) (%)</b>			
<b>Epithelial</b>	20.8 ± 0.77	24.4 ± 0.78	23.4 ± 1.09
<b>Lumen</b>	58.3 ± 1.36	56.6 ± 1.12	51.9 ± 1.42*
<b>Stroma</b>	20.8 ± 1.26	19.0 ± 0.95	24.6 ± 1.48

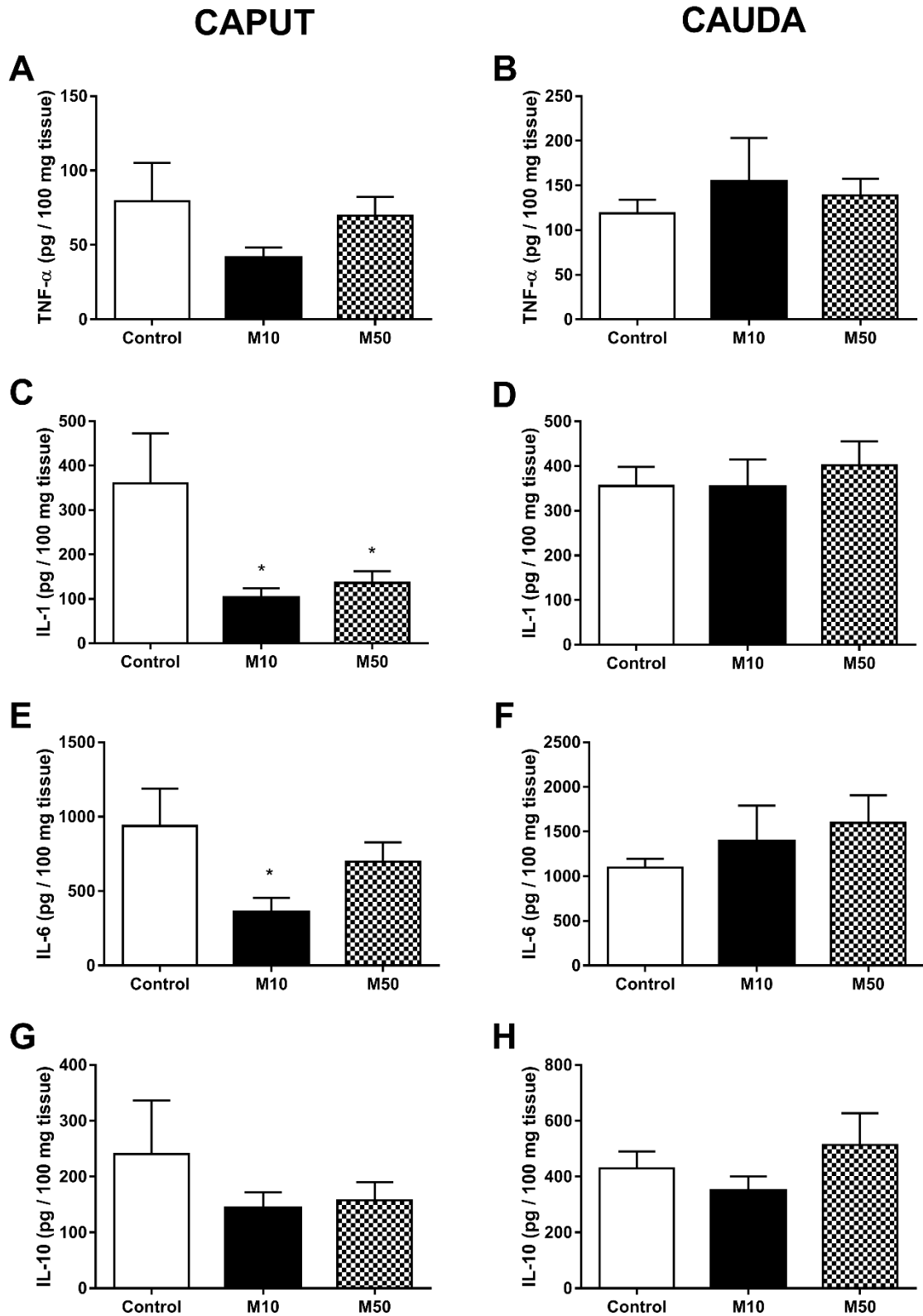
Values expressed as mean ± S.E.M. One-way ANOVA test with *a posteriori* Dunnet's test. \* $p < 0.05$ . Asterisks indicates groups that differ statistically from control group. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion



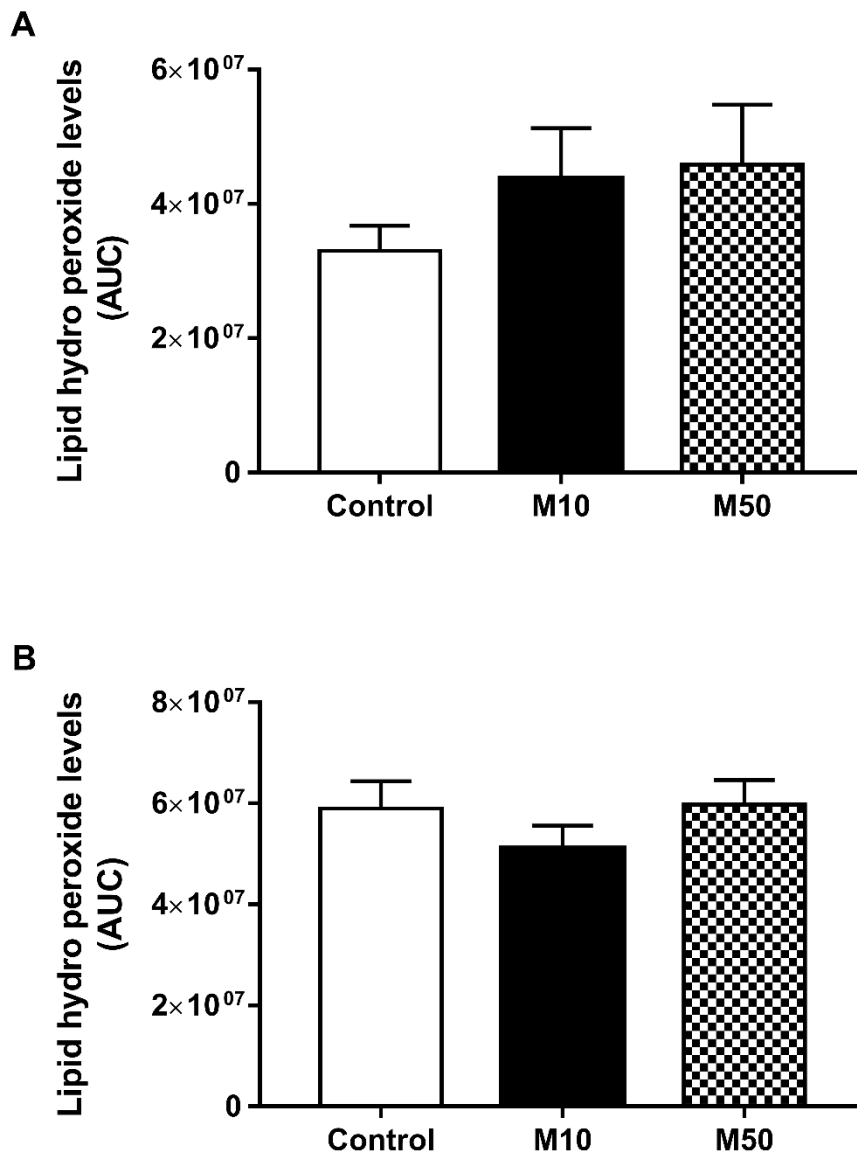
**Figure 1. Histopathological analysis of caput and cauda epididymis.** Photomicrograph of caput (A – D) and cauda (E – G) epididymis sections from control (A and E), M10 (B and F) and M50 (C, D and G) groups. A, E, F and G: epithelium, lumen and stroma with normal aspect. B, C and D: presence of vacuoles in the epithelium (asterisk), multi-nucleated (arrow) and round cells (head of arrow) in the lumen. *L*, lumen; *Ep*, epithelium; *S*, strom. Hematoxylin and eosin stain.



**Figure 2. Inflammatory profile of epididymis.** Number de neutrophils (A and C) and macrophages (B and D) in caput (A and B) or cauda (C and D) epididymis. Data are the mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  in relation to control group. One-way ANOVA test, with the post hoc Dunnett's test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion; MPO - myeloperoxidase; NAG - N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase.



**Figure 3. Cytokine levels in the epididymis.** Caput (A, C, E, and G) and cauda (B, D, F and H) epididymis from control and malathion-treated rats. (A, B) TNF- $\alpha$ ; (C, D) IL-1 $\beta$ ; (E, F) IL-6 and (G, H) IL-10. Data are the mean  $\pm$  S.E.M. \* $p$  < 0.05 in relation to control group. One-way ANOVA test, with the post hoc Dunnett's test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion.



**Figure 4. Chemiluminescence induced by *tert*-butyl hydro peroxide on epididymis.** Caput (A) and cauda (B) epididymis. Values expressed as the mean  $\pm$  S.E.M..  $p > 0.05$ . One-way ANOVA test. M10 - rats treated with 10 mg kg<sup>-1</sup> malathion; M50 - rats treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> malathion; AUC - area under curve.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo abordou um novo delineamento experimental o qual reflete a atual situação ambiental no qual juvenis e adolescentes estão expostos ao malation numa situação de combate ao mosquito *Aedes aegypti*; vetor das doenças causadas pelos vírus zika, dengue, chikungunya e, mais recentemente, febre amarela. Vale ressaltar que ambas as doses são consideradas muito baixas em relação à DL50, NOAEL e à literatura.

Nestas condições experimentais, conclui-se que a exposição a baixas doses de malation durante os períodos juvenil e peripuberal apresentou toxicidade para o desenvolvimento pós-natal do sistema genital masculino, observado através dos parâmetros avaliados nos testículos e epidídimos. O testículo se mostrou mais susceptível às alterações morfológicas devido à toxicidade apresentada pelo inseticida malation via estresse oxidativo, enquanto que o epidídimo foi mais susceptível a alterações de perfil inflamatório.

## REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO DA INTRODUÇÃO

ABRASCO, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. **Nota técnica sobre microcefalia e doenças vetoriais relacionadas ao Aedes aegypti: os perigos das abordagens com larvicidas e nebulizações químicas – fumacê.** Disponível em: <[https://www.abrasco.org.br/site/noticias/institucional/nota-tecnica-sobre-microcefalia-e-doencas-vetoriais-relacionadas-ao-aedes-aegypti-os-perigos-das-abordagens-com-larvicidas-e-nebulizacoes-quimicas-fumace/15929/#\\_ftn12](https://www.abrasco.org.br/site/noticias/institucional/nota-tecnica-sobre-microcefalia-e-doencas-vetoriais-relacionadas-ao-aedes-aegypti-os-perigos-das-abordagens-com-larvicidas-e-nebulizacoes-quimicas-fumace/15929/#_ftn12)>. Acesso em: 18 dez. 2017.

AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1, 2014.

AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K. R. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. **The Journal of Urology**, v. 152, p. 107–110, 1994.

AHMED, R. et al. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 5, p. 443–450, 1 maio 2000.

AITKEN, R. J. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 5, p. 2017–2025, 1995.

AITKEN, R. J. The Amoroso Lecture The human spermatozoon - a cell in crisis? **Reproduction**, v. 115, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 1999.

AITKEN, R. J. et al. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 203–211, 2007.

AKGUR, S. A. et al. PARAOXONASE AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITIES IN HUMANS EXPOSED TO ORGANOPHOSPHOROUS COMPOUNDS. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 58, n. 8, p. 469–474, 24 dez. 1999.

ALONZO, H. G. A.; CORRÊA, C. L. Praguicidas. In: ALONZO, H. G. A.; CORRÊA, C. L. (Eds.). **Fundamentos de Toxicologia**. 4° ed. São Paulo: Sao Paulo, SP: Atheneu Editora, 2003. p. 324.

AMANN, R. P. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. **Environmental Health Perspectives**, v. 70, p. 149–158, 1986.

AMORY, J. K.; BREMNER, W. Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 182, n. 2, p. 175–179, 2001.

ANTON, F. et al. A comparative study of mast cells and eosinophil leukocytes in the mammalian testis. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 45, n. 4, p. 209–218, 1998.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Monografia Autorizada: Malationa**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M01%2B%2BMalationa.pdf/abfcd7f8-da29-4c99-8586-054cbfbae2e9>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

ARMSTRONG, J. S. et al. CHARACTERIZATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES INDUCED EFFECTS ON HUMAN SPERMATOZOA MOVEMENT AND ENERGY METABOLISM. **Free Radical Biology and Medicine**<sup>1</sup>, v. 26, n. 7, p. 869–880, 1999.

ATSDR, A. FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological Profile for Malathion**. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=522&tid=92>>. Acesso em: 13 dez. 2017.

BAKER, H. W. et al. Treatment of sperm autoimmunity in men. **Clinical reproduction and fertility**, v. 2, n. 1, p. 55–71, mar. 1983.

BANERJEE, B. D. et al. A comparative evaluation of immunotoxicity of malathion after subchronic exposure in experimental animals. **Indian journal of experimental biology**, v. 36, n. 3, p. 273–82, mar. 1998.

BARRIOS, B. Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 4, p. 539–549, 2005.

BEDFORD, J. M. Male reproductive System. In: **Handbook of physiology**. [s.l.] Washington DC: American Physiology Society, 1975. p. 303–18.

BELLGRAU, D. et al. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 1, 1996.

BENTON, L.; SHAN, L.; HARDY, M. Differentiation of adult Leydig cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, n. 1, p. 61–68, 1995.

BHUSHAN, S. et al. Testicular macrophages: Role in immune privilege and defense. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 115, n. 51, 2016.

BIALAS, M. et al. ORIGINAL ARTICLE: The Role of IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and its Receptors TNFR1 and TNFR2 in the Local Regulatory System of Normal and Impaired Human Spermatogenesis. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 62, n. 1, p. 51–59, 9 jun. 2009.

BOEKELHEID, K.; JOHNSON, K. J.; RICHBURG, J. H. Sertoli cell toxicants. In: **Sertoli cell Biology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 345–382.

BOUCHARD, M. A Toxicokinetic Model of Malathion and Its Metabolites as a Tool to Assess Human Exposure and Risk through Measurements of Urinary Biomarkers. **Toxicological Sciences**, v. 73, n. 1, p. 182–194, 1 maio 2003.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 179–293, dez. 2007.

BRASIL, I. O. C. **NOTA TÉCNICA No 4/2016/IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA**. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/ioc/media/NT04\\_2016\\_IOC\\_inseticida\\_aviao\\_dv\\_rlo\\_ppublicacao.pdf](http://www.fiocruz.br/ioc/media/NT04_2016_IOC_inseticida_aviao_dv_rlo_ppublicacao.pdf)>. Acesso em: 18 dez. 2017.

BRASIL, M. D. S. **Declara Emergência em Saúde Pública de importância Nacional (ESPIN) por alteração do padrão de ocorrência de microcefalias no Brasil**. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2015/prt1813\\_11\\_11\\_2015.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2015/prt1813_11_11_2015.html)>. Acesso em: 18 dez. 2017a.

BRASIL, M. D. S. **Diretriz geral SNCC: sistema de coordenação e controle para intensificar as ações de mobilização e combate ao mosquito**. Disponível em: <[http://combateaedes.saude.gov.br/images/Diretriz\\_Geral\\_SNCC\\_2015.pdf](http://combateaedes.saude.gov.br/images/Diretriz_Geral_SNCC_2015.pdf)>. Acesso em: 18 dez. 2017b.

BRITAN, A. et al. Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. **Cell and Tissue Research**, v. 324, n. 2, p. 301–310, 2 maio 2006.

BROCARD, P. S. et al. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. **Toxicology**, v. 207, n. 2, p. 283–291, 14 fev. 2005.

BRYNIARSKI, K. et al. Subpopulations of mouse testicular macrophages and their immunoregulatory function. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 52, n. 1, p. 27–35, 2004.

BUSTOS-OBREGON, E.; GONZALEZ-HORMAZABAL, P. Effect of a single dose of malathion on spermatogenesis in mice. **Asian J. Androl**, v. 5, p. 105–107, 2003.

CARLOS, E. A. et al. Simultaneous Determination of the Organochlorine and Pyrethroid Pesticides in Drinking Water by Single Drop Microextraction and Gas Chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 8, p. 1217–1227, 2013.

CARVALHO, G.; RIBEIRO, S. **Intoxicações por agrotóxicos em trabalhadores dos pomares de maçãs**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

CHIASSON, R. B. **Laboratory anatomy of the white rat**. [s.l.: s.n.].

CHOUDHARY, N. et al. Effect of malathion on reproductive system of male rats Nisha. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. March, p. 259–262, 2008.

CHRISTENSEN, A. K.; MASON, N. R. Comparative Ability of Seminiferous Tubules and Interstitial Tissue of Rat Testes To Synthesize Androgens from Progesterone-4-14 C in Vitro. **Endocrinology**, v. 76, n. 4, p. 646–656, abr. 1965.

CLEGG, E. D.; PERREAULT, S. D.; KLINEFELTER, G. R. Assessment of male reproductive toxicology. In: **Principles and methods of toxicology**. [s.l.] Philadelphia: Taylor & Francis, 2001. p. 1263–1299.

CLELAND, K. The structure and function of the Epididymis. 1. The histology of the Rat Epididymis. **Australian Journal of Zoology**, v. 5, n. 3, p. 223, 1957.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological reviews**, v. 52, n. 1, p. 198–236, 1972.

COLEONE, A. C. **Avaliação da dissipação do inseticida malation utilizado em nebulização a ultrabaixo volume no controle da dengue: avaliação ecotoxicológica e de risco ambiental**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.

CONRAD, M. et al. ROS, thiols and thiol-regulating systems in male gametogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1850, n. 8, p. 1566–1574, ago. 2015.

CONTRERAS, H. R.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Morphological alterations in mouse testis by a single dose of malathion. **The Journal of experimental zoology**, v. 284, n. 3, p. 355–9, 1 ago. 1999.

COOPER, J.; DOBSON, H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**, v. 26, n. 9, p. 1337–1348, 1 set. 2007.

COSENTINO, M. J. et al. Histopathology to Various of Prepubertal Durations Rat Testes Subjected Torsion of Spermatic. **J. Androl**, v. 7, p. 23–31, 1985.

CUASNICÚ, P. S. et al. Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In: **The epididymis: from molecules to clinical practice**. [s.l.] New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2002. p. 389–403.

DA ROS, V. G. et al. Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 5, p. 1325–1332, 2004.

DA SILVA, N. et al. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 141, n. 5, p. 653–63, 1 maio 2011.

DACHEUX, J. L. et al. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, n. 2 SPEC. ISS., p. 319–341, 2005.

DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**, v. 147, n. 2, 2014.

DAL SECCO, V. et al. Mouse Sertoli Cells Display Phenotypical and Functional Traits of Antigen-Presenting Cells in Response to Interferon Gamma. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 2, p. 234–242, 1 fev. 2008.

DAMASCENO, D. C. et al. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 235–244, 2002.

DAMGAARD, I. N. et al. Impact of exposure to endocrine disrupters in utero and in childhood on adult reproduction. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 289–309, 2002.

DRABOVICH, A. P. et al. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. **Nature Reviews Urology**, v. 11, n. 5, p. 278–288, 8 abr. 2014.

DUCKETT, R. J. et al. Effect of Chorionic Gonadotropin and Flutamide on Leydig Cell and Macrophage Populations in the Testosterone-Estradiol-Implanted Adult Rat. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 6, p. 656–662, 1997.

DYM, M. Basement Membrane Regulation of Sertoli Cells\*. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 1, p. 102–115, fev. 1994.

EPA, E. P. A. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Malathion. In: **EPA 738-R-06-030; U.S , Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs**. Whashington, DC: U.S. Government Printing Office, 2006.

ESKENAZI, B. et al. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. **Human Reproduction**, v. 20, n. 4, p. 1006–1012, 1 abr. 2005.

ESPINOZA-NAVARRO, O.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Effects of Malathion on Cellularity and Sperm Differentiation in Testis and Epididymis of Adult Rats. **International Journal of Andrology**, v. 32, n. 1, p. 119–124, 2014.

EZER, N.; ROBAIRE, B. Androgenic Regulation of the Structure and Functions of the Epididymis. In: **The epididymis: from molecules to clinical practice**. [s.l.] New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2002. p. 279–316.

FAO, F. AND A. O. **Pesticide residues in food : report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues**. [s.l.] Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997.

FINKEL, T. Oxygen radicals and signaling Toren Finkel. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 248–253, 1998.

FLICKINGER, C. J. et al. Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. **The Anatomical record**, v. 248, n. 3, p. 380–90, jul. 1997.

FLORES, A. et al. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 111–124, 2004.

FOLEY, G. L. Overview of male reproductive pathology. **Toxicologic pathology**, v. 29, n. 1, p. 49–63, 2001.

FONTENELE, E. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54, n. 1, p. 6–16, 2010.

FORTUNATO, J. J. et al. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. **Neurotoxicity Research**, v. 9, n. 1, p. 23–28, mar. 2006.

FRACZEK, M.; KURPISZ, M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 108, p. 98–104, 2015.

FRANÇA, L. R. et al. The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. **Andrology**, v. 4, n. 2, p. 189–212, 2016.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 300–318, jan. 2005.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/CENTRO DE INFORMAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA/SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS - SINITOX. **Casos de Intoxicação por Agrotóxico de Uso Agrícola por Unidade Federada, Segundo Circunstância Registrado em 2012.**

GARTNER, L.; HIATT, J. Sistema Reprodutor Masculino. In: **Tratado de Histologia**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2007. p. 400–18.

GENG, X. et al. Malathion-induced testicular toxicity is associated with spermatogenic apoptosis and alterations in testicular enzymes and hormone levels in

male Wistar rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 659–667, 2015.

GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, R. J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Human Reproduction**, v. 26, n. 7, p. 1628–1640, 2011.

GIRI, S. et al. Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 514, n. 1–2, p. 223–231, 15 fev. 2002.

GOLUB, M. S. et al. Public Health Implications of Altered Puberty Timing. **Pediatrics**, v. 121, n. Supplement 3, p. S218–S230, fev. 2008.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 9, n. 4, p. 411–416, 1998.

GRIVEAU, J. F.; RENARD, P.; LANNOU, D. LE. Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process. **International Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 67–74, 1 abr. 1995.

HALES, D. B.; DIEMER, T.; HALES, K. H. Role of cytokines in testicular function. **Endocrine**, v. 10, n. 3, p. 201–217, jun. 1999.

HASCHEK, W.; ROUSSEAUX, C. G. Male reproductive system. In: **Fundamentals of Toxicologic Pathology**. [s.l.] San Diego: Academic Press, 1998. p. 443–84.

HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. **Anatomy of the laboratory rat**. [s.l.] Baltimore: Williams and Wilkins, 1976.

HEDGER, M. P. Immunophysiology and Pathology of Inflammation in the Testis and Epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 625–640, 2011a.

HEDGER, M. P. Immunophysiology and Pathology of Inflammation in the Testis and Epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 625–640, 2011b.

HEDGER, M. P. Immune Privilege of the Testis: Meaning, Mechanisms, and Manifestations. In: STEIN-STREILEIN, J. (Ed.). . **Infection, Immune Homeostasis and Immune Privilege**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012. p. 31–52.

HEDGER, M. P.; MEINHARDT, A. Cytokines and the immune-testicular axis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2003.

HENKEL, R. R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 1, p. 43–52, 15 jan. 2011.

HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal cell types and their function. In: **The epididymis: from molecules to clinical practice**. [s.l.] New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2002. p. 81–202.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in hematology**, v. 26, n. 4, p. 277–285, 1989.

HODGSON, Y.; HUDSON, B. Leydig Cell Function. In: **25 of the series Monographs on Endocrinology**. [s.l.: s.n.]. p. 107–132.

INCA, I. N. DE C. J. A. G. DA S. **POSICIONAMENTO DO INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA ACERCA DOS AGROTÓXICOS**. Disponível em:

<[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento\\_do\\_inca\\_sobre\\_os\\_agrotoxicos\\_06\\_abr\\_15.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf)>. Acesso em: 5 dez. 2017.

ITOH, M. et al. Tissue microcircumstances for leukocytic infiltration into the testis and epididymis in mice. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, p. 57–67, 2005.

JADHAV, R. K. et al. Distribution of malathion in body tissues and fluids. **Forensic Science International**, v. 52, n. 2, p. 223–229, 1 jan. 1992.

JOHNSON, L.; WELSH, T. H. J.; WILKER, C. E. Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. In: **Comprehensive Toxicology**. [s.l.] New York: Pergamon, 1997. p. 5–61.

JRAD-LAMINE, A. et al. Deficient Tryptophan Catabolism along the Kynurenine Pathway Reveals That the Epididymis Is in a Unique Tolerogenic State. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 10, p. 8030–8042, 11 mar. 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor masculino. In: **Histologia Básica**. [s.l.] Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 415–31.

KARALIS, K. P. et al. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS Journal**, v. 276, n. 20, p. 5747–5754, 1 out. 2009.

KARALLIEDDE, L.; SENANAYAKE, N. ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDE POISONING. **Br. J. Anaesth**, v. 63, p. 736–750, 1989.

KARCZMAR, A. Invited Review Anticholinesterases: dramatic aspects of their use and misuse. **Neurochemistry International**, v. 32, n. 5–6, p. 401–411, 1 maio 1998.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Publishing Group**, v. 11, 2010.

KEMPINAS, W. G.; KLINEFELTER, G. R. No TitleThe epididymis as a target for toxicants. In: **Comprehensive Toxicology**. [s.l.] Oxford: Academic press, 2010. p. 149–66.

KEMPLE, M. ABCs of toxicology – basic definitions. **J Pesticide Reform**, p. 22–23, 2001.

KERR, J. B.; MADDOCKS, S.; SHARPE, R. M. Testosterone and FSH have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis. **Cell & Tissue Research**, v. 268, n. 1, p. 179–189, 1992.

KLINEFELTER, G. R. et al. Discriminant Analysis Indicates a Single Sperm Protein (SP22) Is Predictive of Fertility Following Exposure to Epididymal Toxicants. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 139–150, 1997.

KOHNO, S. et al. Immunopathology of murine experimental allergic orchitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 130, n. 6, p. 2675–82, 1 jun. 1983.

KOMÁREK, V. Synopsis of the organ anatomy. In: **The laboratory rat - The Handbook of Experimental Rats**. London: Academic Press, 2000. p. 283–322.

KOVACIC, P. Mechanism of Organophosphates (Nerve Gases and Pesticides) and Antidotes: Electron Transfer and Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 24, p. 2705–2709, 1 dez. 2003.

KUTZ, F. W. et al. Selected pesticide residues and metabolites in urine from a survey of the U.S. general population. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 37, n. 2, p. 277–291, out. 1992.

LAGARRIGUE, M. et al. Revisiting Rat Spermatogenesis with MALDI Imaging at 20- $\mu$ m Resolution. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 3, p. M110.005991, mar. 2011.

LARINI, L. **Praguicidas**. [s.l: s.n.].

LEE, H.-M. et al. Role of Complement Regulatory Proteins in the Survival of Murine Allo-transplanted Sertoli Cells. **J Korean Med Sci**, v. 22, 2007.

LENZI, A. et al. Computer assisted sperm motility analysis at the moment of induced pregnancy during gonadotropin treatment for hypogonadotropic hypogonadism. **J. Endocrinol. Invest**, v. 16, p. 683–686, 1993.

LENZI, A. et al. Antisperm antibody detection: 2. Clinical, biological, and statistical correlation between methods. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 38, n. 3, p. 224–230, 1997.

LEWIS, B.; AITKEN, R. J. A Redox-Regulated Tyrosine Phosphorylation Cascade in Rat Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 611–622, 2001.

LINNET, L. CLINICAL IMMUNOLOGY OF VASECTOMY AND VASOVASOSTOMY. **Urology**, v. 22, n. 2, p. 101–114, 1983.

LIPSETT, M. B. Regulation of testicular functions. **Andrologia**1, v. 8, p. 43–60, 1976.

MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. **Journal of reproduction and fertility**, v. 37, n. 1, p. 179–188, 1974.

MANTOVANI, A.; FUCIC, A. Puberty dysregulation and increased risk of disease in adult life: Possible modes of action. **Reproductive Toxicology**, v. 44, p. 15–22, 2014.

MARESZ, K. et al. IL-13 induces the expression of the alternative activation marker Ym1 in a subset of testicular macrophages. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 78, p. 140–148, 2008.

MARONI, M. et al. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. **Toxicology**, v. 7, n. 143, p. 1–118, 2000.

MARTÍNEZ, P.; PROVERBIO, F.; CAMEJO, M. I. Sperm lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines. **Asian J Androl**, v. 9, p. 102–107, 2007.

MEACHEM, S. J.; MCLACHLAN, R. I. Maintain Studies. v. 20, 1999.

MEINHARDT, A. et al. Local Regulation of Macrophage Subsets in the Adult Rat Testis: Examination of the Roles of the Seminiferous Tubules, Testosterone, and Macrophage-Migration Inhibitory Factor 1. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 59, p. 371–378, 1998.

MEINKING, T. L. et al. Efficacy of a Reduced Application Time of Ovide Lotion (0.5% Malathion) Compared to Nix Creme Rinse (1% Permethrin) for the Treatment of Head Lice. **Pediatric Dermatology**, v. 21, n. 6, p. 670–674, 1 nov. 2004.

MELCHIORRI, D. et al. Paraquat Toxicity and Oxidative Damage REDUCTION BY MELATONIN. **Biochemical Pharmacology RIOCHEM PHARMACOL**, v. 518, n. 1, p. 1095–1099, 1996.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, n. 1, p. 273–275, 15 fev. 1984.

MENG, J. et al. Sertoli Cell-Specific Deletion of the Androgen Receptor Compromises Testicular Immune Privilege in Mice. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 85, p. 254–260, 2011.

MILLER, R. J.; KILLIAN, G. J. Morphometric Analyses of the Epididymis from Normal and Vasectomized Rats. **Journal of Andrology**, v. 8, n. 5, p. 279–291, 1987.

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. The effect of hydrogen peroxide-induced oxidative stress on leukocytes depends on age and physical training in healthy human subjects carrying the same genotypes of antioxidant enzymes' gene polymorphisms. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 6, p. 807–812, 1 nov. 2010.

MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299–311, 2002.

MORGADE, C.; BARQUET, A. Body distribution of malathion and its metabolites in a fatal poisoning by ingestion. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 10, n. 2, p. 321–325, 15 ago. 1982.

MORI, H.; CHRISTENSEN, A. K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. **The Journal of Cell Biology**, v. 84, n. 2, p. 340–354, 1 fev. 1980.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747–806, 2004.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 5, p. 564–591, out. 2015.

MURAKAMI, R.; MIZUNO, T. Proximal-distal sequence of development of the skeletal tissues in the penis of rat and the inductive effect of epithelium. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 92, p. 133–43, 1986.

NASHAN, D. et al. Immuno-competent cells in the murine epididymis. **International Journal of Andrology**, v. 12, n. 1, p. 85–94, 1 fev. 1989.

NAZIROGLU, M. Enhanced Testicular Antioxidant Capacity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 94, n. 1, p. 61–71, 2003.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system<sup>1</sup> <sup>1</sup>This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg,. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, dez. 2001.

O'BRYAN, M. K. et al. Human Seminal Clusterin (SP-40,40) Isolation and. **Clin. Invest**, v. 85, p. 1477–1486, 1990.

O'SHAUGHNESSY, P. Testicular development. In: **The physiology of Reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 601–771.

OJEDA, S. R. et al. Recent Advances in the Endocrinology of Puberty. **Endocrine Reviews**, v. 1, n. 3, p. 228–257, jul. 1980.

OJEDA, S. R.; URBANSKI, H. F. Puberty in the rat. In: **The physiology of reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 365–409.

OKUMA, Y. Reciprocal regulation of activin A and inhibin B by interleukin-1 (IL-1) and follicle-stimulating hormone (FSH) in rat Sertoli cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 185, n. 1, p. 99–110, 1 abr. 2005.

ORGBIN-CRIST, M.-C.; DANZO, B. J.; DAVIES, J. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: **Handbook of Physiology**. [s.l.] Washington DC: American Physiology Society, 1975. p. 319–38.

PEDLOWSKI, M. A. et al. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. **Crop Protection**, v. 31, n. 1, p. 113–118, 1 jan. 2012.

PÉREZ, C. V. et al. Dual role of immune cells in the testis. **Spermatogenesis**, v. 3, n. 1, 20 jan. 2013a.

PÉREZ, C. V. et al. Dual role of immune cells in the testis: Protective or pathogenic for germ cells? **Spermatogenesis**, v. 3, n. 1, p. e23870, 2013b.

PEROBELLI, J. E. **Morfofisiologia do Sistema Genital Masculino de Ratos Púberes e Adultos Após Privação Androgênica Durante a Pré-Puberdade**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2012.

PEROBELLI, J. E. The male peripubertal phase as a developmental window for reproductive toxicology studies. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 34, p. 5398–415, 2014.

PINOTTI, M. M. Z.; SANTOS, J. C. P. From the ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1797–1803, out. 2013.

PODESTÁ, E. J.; RIVAROLA, M. A.; JYUJO, T. Concentration of Androgens in Whole Testis, Seminiferous Tubules and Interstitial Tissue of Rats at Different Stages of Development 1. **Endocrinology**, v. 95, n. 2, p. 455–461, 1 ago. 1974.

POSSAMAI, F. P. **Estudo do estresse oxidativo em órgãos de ratos Wistar adultos induzidos à intoxicação por Malation**. [s.l.] Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2005.

POTASHNIK, H. et al. Interleukin-6 expression during normal maturation of the mouse testis. **European cytokine network**, v. 16, n. 2, p. 161–5, 2005.

RABURN, D. J. et al. Regulation of the macrophage population in postnatal rat testis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 24, p. 139–151, 1993.

RATO, L. et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**, v. 9, n. 6, p. 330–338, 1 maio 2012.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 14, n. 10, p. 149–158, 2009.

RIBEIRO, M. et al. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Quim Nova**, v. 30, n. 3, p. 688–694, 2007.

RICHMOND, E. J.; ROGOL, A. D. Male pubertal development and the role of androgen therapy. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 338–344, 2007.

RIVAL, C. et al. Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 70, n. 1–2, p. 43–58, jun. 2006.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. **The Epididymis**. Fourth Ed. ed. [s.l.] Elsevier, 2015.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M.-C. The Epididymis. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, p. 1071–1148, 2006.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal Reprod Fertil**, v. 54, n. 1, p. 103–107, 1978.

ROBERTS, K. P. WHAT ARE THE COMPONENTS OF THE MALE REPRODUCTIVE-SYSTEM. **JOURNAL OF ANDROLOGY**, p. 1–4, 1995.

RODRIGUEZ, C. M.; KIRBY, J. L.; HINTON, B. T. The development of the epididymis. In: **The epididymis: from molecules to clinical practice**. [s.l.] New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2002. p. 251–68.

RODRIGUEZ, J. A.; FAVARETTO, A. L. V. Sistema reprodutor. In: **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 877–917.

RUSSEL, L. D. Mammalian spermatogenesis. In: **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater: Cache River Press, 1990. p. 1–40.

SANBERG, P. R. et al. Article Commentary: The Testis-Derived Cultured Sertoli Cell as a Natural Fas-L Secreting Cell for Immunosuppressive Cellular Therapy. **Cell Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 191–193, 22 mar. 1997.

SANTOS, V. M. R. DOS et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159–170, fev. 2007.

SCHEER, H.; ROBAIRE, B. Steroid  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -Reductase and 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Rat Epididymis during Development\*. **Endocrinology**, v. 107, n. 4, p. 948–953, 1 out. 1980.

SELMİ, S. et al. Histopathological, biochemical and molecular changes of reproductive function after malathion exposure of prepubertal male mice. **RSC Advances**, v. 5, n. 18, p. 13743–13753, 2015.

SENANAYAKE, N.; KARALLIEDDE, L. Neurotoxic Effects of Organohosphorus Insecticides. **New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 13, p. 761–763, 26 mar. 1987.

SERRE, V.; ROBAIRE, B. Distribution of Immune Cells in the Epididymis of the Aging Brown Norway Rat Is Segment-Specific and Related to the Luminal Content. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 61, p. 705–714, 1999.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835–850, dez. 1996.

SHARMA, R. K.; ALKA, G. MALATHION INDUCED CHANGES IN CATALASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN TESTICULAR TISSUES OF GOAT IN VITRO. **International Journal of Pharmacy and Biological Science**, v. 3, n. 4, p. 193–197, 2013.

SHARPE, R. M. Declining sperm counts in men - is there an endocrine cause? **Journal of Endocrinology**, v. 136, n. 3, p. 357–360, 1 mar. 1993.

SHARPE, R. M. Development and maturation of the normal male reproductive system. In: **Environmental impacts on reproductive health and fertility**. [s.l.: s.n.].

SILVA, A. P. DA. Avanços sobre a neurotoxicidade induzida pelo pesticida organofosforado malation em modelos experimentais com camundongos. 2007.

SIPIONE, S. et al. Identification of a Novel Human Granzyme B Inhibitor Secreted by Cultured Sertoli Cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 8, p. 5051–5058, 2006.

SKINNER, M. K.; ANWAY, M. D. Seminiferous cord formation and germ-cell programming: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1061, p. 18–32, 2005.

SKINNER, M. K.; MOSES, H. L. Transforming Growth Factor $\beta$  Gene Expression and Action in the Seminiferous Tubule: Peritubular Cell-Sertoli Cell Interactions. **Molecular Endocrinology**, v. 3, n. 4, p. 625–634, 1 abr. 1989.

SLIMEN, S.; SALOUA, E. F.; NAJOUA, G. Oxidative stress and cytotoxic potential of anticholinesterase insecticide, malathion in reproductive toxicology of male adolescent mice after acute exposure. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 17, n. 7, p. 522–30, jul. 2014.

SMITH, L. B.; WALKER, W. H. Hormone signaling in the testis. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 637–690.

STEERS, W. D. Physiology of the vas deferens. **World Journal of Urology**, v. 12, n. 5, p. 281–285, 1994.

SUAREZ-PINZON, W. et al. Testicular Sertoli Cells Protect Islet b-Cells From Autoimmune Destruction in NOD Mice by a Transforming Growth Factor-b1–Dependent Mechanism. **Diabetes**, v. 49, 2000.

SUN, E. L.; FLICKINGER, C. J. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. **Am J Anat**, v. 154, n. 1, p. 27–55, 1979.

SUN, Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 6, p. 583–599, 1990.

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In: **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 161–176.

TUNG, K. Immunologic basis of male infertility. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 57, n. 1, p. 1–4, jul. 1987.

TURNER, T. T. De Graaf's Thread: The Human Epididymis. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 3, p. 237–250, 2008.

U.S., E. Office of Pesticides and Toxic Substances. **Guidance for the registration of pesticides products containing malathion as the active ingredient.**, v. Washington, 2000.

VERAJANKORVA, E. et al. IL-10 is highly expressed in the cryptorchid cryptepididymal epithelium: a probable mechanism preventing immune responses against autoantigenic spermatozoa in the epididymal tubule. **International Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 129–133, 1 jun. 2002.

VERNET, P. et al. Analysis of Reactive Oxygen Species Generating Systems in Rat Epididymal Spermatozoa. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 65, p. 1102–1113, 2001.

WALKER, W. H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**, v. 130, n. 1, p. 15–28, 2005.

WANG, J. et al. Leukocyte Populations of the Adult Rat Testis Following Removal of the Leydig-Cells by Treatment with Ethane Dimethane Sulfonate and Subcutaneous Testosterone Implants'. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 51, p. 551–561, 1994.

WARREN, M. et al. Assessment of exposure to organophosphate insecticides during spraying in Haiti: monitoring of urinary metabolites and blood cholinesterase levels. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 2, p. 353–60, 1985.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO recommended insecticides for space spraying against mosquitoes.** Disponível em: <[http://www.who.int/whopes/Insecticides\\_for\\_space\\_spraying\\_Jul\\_2012.pdf](http://www.who.int/whopes/Insecticides_for_space_spraying_Jul_2012.pdf)>. Acesso em: 18 dez. 2017.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides.** Disponível em: <<https://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **DENGUE GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL.** Disponível em:

<<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

XIAO, X. et al. Germ Cell Transport Across the Seminiferous Epithelium During Spermatogenesis. **Physiology**, v. 29, n. 4, p. 286–298, 1 jul. 2014.

YULE, T. D.; TUNG, K. S. Experimental autoimmune orchitis induced by testis and sperm antigen-specific T cell clones: an important pathogenic cytokine is tumor necrosis factor. **Endocrinology**, v. 133, n. 3, p. 1098–1107, 1 set. 1993.

ZANATO, V. F. et al. Sexual development of male Wistar rats. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 27, n. 5, p. 1273–80, maio 1994.

ZANIN, M. et al. Agrotóxicos: a realidade do Paraná. **Curitiba: Edição da Secretaria do Meio Ambiente do Paraná.**, 1992.

ZHANG, H. et al. Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 4260, 3 maio 2015.

ZIRKIN, B. R.; CHEN, H. Regulation of Leydig Cell Steroidogenic Function During Aging<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 4, p. 977–981, 1 out. 2000.

## ANEXO A

### Aprovação de Projeto pelo Comitê de Ética (CEUA-UEL)



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 137/2016

Londrina, 13 de Julho de 2016.

Prezada Pesquisadora,

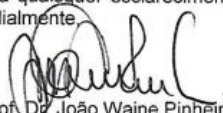
Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação dos efeitos do inseticida Malation sobre o desenvolvimento do sistema genital masculino, gastrointestinal e renal de ratos desde o período juvenil até a puberdade**", protocolo CEUA nº **12305.2016.65**, sob a responsabilidade de **Glaura Scantamburlo Alves Fernandes**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **05/07/2016**.

O objetivo do projeto é avaliar se a exposição ao Malation durante o período peripuberal poderá trazer prejuízos para o desenvolvimento dos sistemas genital masculino, gastrointestinal, renal e hepático de ratos. Os animais serão distribuídos casualmente em três grupos experimentais (n=25 animais/grupo). Dois grupos de animais serão tratados com Malation nas doses de 10 mg/Kg ou 50 mg/Kg de peso corpóreo via gavagem. Essas doses correspondem a 0,5% e 2,5%, respectivamente, da DL50 oral para ratos (DL50 oral =2000 mg/kg) (U S EPA, 2000). O outro grupo (grupo controle) receberá apenas o veículo (óleo de soja) em igual volume. No 80º dia experimental os ratos serão anestesiados com a associação de xilazina e quetamina e mortos por punção cardíaca para a coleta do sangue em tubo heparinizado (hepararina sódica) para dosagens hormonais. GI 1

Vigência do Projeto	30/08/2016 a 30/08/2019
Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	75
Peso/Idade	Indeterminado / 22 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Testículos, epidídimos, vesícula seminal, próstata, sangue, fígado, estômago, rim, intestino, fêmur

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

  
 Prof. Dr. João Waine Pinheiro  
 Vice-Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

**Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes**

Coordenadora do Projeto

Departamento de Biologia Geral / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia Waldiceu A. Verrí Junior (Coord. do Biotério Central/UEL); Chefe do Departamento de Biologia Geral e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

## **ANEXO B**

### **Guide for Authors**

#### **Toxicology:**

<https://www.elsevier.com/journals/toxicology/0300-483x/guide-for-authors>

#### **Toxicology Letters:**

<https://www.elsevier.com/journals/toxicology-letters/0378-4274/guide-for-authors>